



MASTER-THESIS

Herr
Rico Hellwig

**Prozessoptimierung am
Chemostatsystem zur
kontinuierlichen
photobiologischen
Wasserstoffproduktion unter
Verwendung von *Rhodobacter
sphaeroides* DSM 158**

2014

MASTER-THESIS

**Prozessoptimierung am
Chemostatsystem zur
kontinuierlichen
photobiologischen
Wasserstoffproduktion unter
Verwendung von *Rhodobacter
sphaeroides* DSM 158**

Autor:

Rico Hellwig

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO12w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dipl.-Ing. Karsten Helbig

Mittweida, 08 2014

Bibliografische Angaben

Hellwig, Rico: Prozessoptimierung am Chemostatsystem zur kontinuierlichen photobiologischen Wasserstoffproduktion unter Verwendung von *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158, 67 Seiten, 32 Abbildungen, Hochschule Mittweida (FH), Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Master-Thesis, 2014

Referat

Die Produktion von Biowasserstoff mit unterschiedlichen Mikroorganismen ist einer der vielversprechendsten Wege, kostengünstig und umweltschonend molekularen Wasserstoff für die Wirtschaft zu gewinnen. Es existieren bereits viele Arbeiten zu diesem Thema. Die Komplexität und Vielfalt der Möglichkeiten ist jedoch bei weitem nicht ausgeschöpft. Die Optimierung der bestehenden Methoden steht daher momentan im Vordergrund der Forschung. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Optimierung der Kultivierungsbedingungen des Organismus *Rhodobacter sphaeroides* im kontinuierlichem Betrieb. Hauptsächlich sollen die Durchflussraten sowie die Glutaminsäurekonzentration für den Chemostat angepasst werden. Außerdem erfolgten einzelne Versuche zur Optimierung der Wasserstoffausbeute.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Vorwort	IV
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Wasserstoff	3
2.2 Wasserstoff Darstellung	4
2.3 Wasserstoffwirtschaft	7
2.4 Brennstoffzelle	7
2.5 Purpurbakterien	11
2.6 Photosynthese	12
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.2 Methoden	30
4 Ergebnisse	45
4.1 Batchversuche	45
4.2 Chemostatversuche	50
5 Diskussion	53
5.1 Batchversuche	53
5.2 Chemostatversuche	55
6 Zusammenfassung	59
7 Ausblick	61
Literaturverzeichnis	63

II. Abbildungsverzeichnis

1.1	Energiedichte von Wasserstoff.....	2
2.1	Wasserstoff - natürliche Isotope	3
2.2	Wasserelektrolyse	5
2.3	Wasserstoffproduktion in Europa	8
2.4	Brennstoffzelle - PEMFC - Schema	10
2.5	Wasserstoffkreislauf	11
2.6	Kladogramm - Proteobakterien	13
2.7	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14
2.8	Grundstruktur eines Chlorophyllmoleküls	15
2.9	Absorptionspektren unterschiedlicher Photosynthesepigmente	16
2.10	Aufbau des Lichtsammelkomplexes II	16
2.11	Chloroplast - Schema	17
2.12	Photosynthese - Schema	19
2.13	Aufbau des Photoreaktionszentrums aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	21
2.14	Aktive Zentren der Hydrogenasen	23
2.15	Aktives Zentrum einer [FeFe]-Hydrogenase	24
2.16	[NiFe]-Hydrogenase	25
2.17	[FeMo]-Nitrogenase	26
2.18	[FeMo]-Nitrogenase-Weg der Elektronen	27
3.1	Vorkulturbad	33
3.2	Applikon 1l Reaktor im Beleuchtungsring	33
3.3	Versuchsaufbau - Batchsystem - Schema	34
3.4	Versuchsaufbau - Chemostatsystem - Schema	37
3.5	Versuchsaufbau - Chemostatsystem - Schema	37
4.1	Verlauf - Halogen-Batch - Diagramm	46
4.2	Verlauf - LED Batch - Diagramm	48
4.3	Verlauf der Fermentation bei unterschiedlichen Substraten	49
4.4	Verlauf - Chemostat	52

5.1	Abbau von Glutaminsäure durch die Glutamatdehydrogenase	54
5.2	x-D-Diagramm Durchflussraten	56
5.3	x-c[GS]-Diagramm Glutaminsäurekonzentrationen	56
5.4	Einfluss der Betriebsbedingungen auf die Wasserstoffproduktion im Chemostat	57

III. Tabellenverzeichnis

3.1 Konzentrationen Kohlenstoffquellen	30
3.2 Zusammensetzung der Spurenelementelösung.....	31
3.3 Zusammensetzung der Vitaminlösung.....	31
3.4 Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA-Lösung)	31
3.5 Betriebsparameter - Batchversuche	43
3.6 Betriebsparameter eines Chemostatversuches	43

IV. Vorwort

Ich möchte das Vorwort dieser Arbeit nutzen um den Menschen zu danken, ohne deren Hilfe die Anfertigung niemals möglich gewesen wäre. Hierbei gilt mein Dank zunächst Prof.Dr.rer.nat.habil. Röbbbe Wünschiers für seine Betreuung aus Mittweida sowie die schnelle unkomplizierte Hilfe wann immer ich sie benötigt habe. Ein weiteres großes Dankeschön geht an Herrn Dr.Ing. Jost Weber. Er ermöglichte es mir die Arbeit an der TU Dresden anzufertigen und half beim Ausfüllen aller möglicher Formalitäten. Dabei hatte er stets für meine Probleme ein offenes Ohr, auch wenn die Zeit knapp war. Außerdem, Danke ich Herrn M.Sc. Felix Krujatz für die oftmals recht illustren Gespräche und seinen Input bei wissenschaftlichen Problemen. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle meinen Betreuer Herrn Dipl.-Ing. Karsten Helbig, der mir als verfahrenstechnischen Neuling mit viel Geduld und gutem Rat stets zur Seite stand. Vor allem auch dann, wenn manches nicht so funktionierte wie es sollte, bewahrte er stets einen kühlen Kopf und half mir alles wieder ins Lot zu bringen. Für die Analytik der Proben sowie für die stete Hilfe bei allen chemischen Fragestellungen danke ich Frau Marina Scholz und Frau Eva Maria Kneschke. Des Weiteren möchte ich auch Frau Katharina Goy nicht unerwähnt lassen. Für ihren Beistand und die tatkräftige Unterstützung bei allen anfallenden Aufgaben möchte ich ihr an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen. Ebenso danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Freundin, dafür, dass sie mich so manchen Tag ohne Murren entbehren konnte, wenn ich mit dieser Arbeit beschäftigt war. Sie versuchte alles störende von mir fern zu halten, damit ich diese Arbeit in Ruhe zu einem guten Ergebnis bringen konnte. Gleiches gilt für meine Eltern und all die lieben Korrekturleser, die versucht haben meine letzten kleinen Fehler aus dieser Arbeit zu entfernen.

„Das Wasser ist die Kohle der Zukunft. Die Energie von morgen ist Wasser, das durch elektrischen Strom zerlegt worden ist. Die so zerlegten Elemente des Wassers, Wasserstoff und Sauerstoff, werden auf unabsehbare Zeit hinaus die Energieversorgung der Erde sichern.“

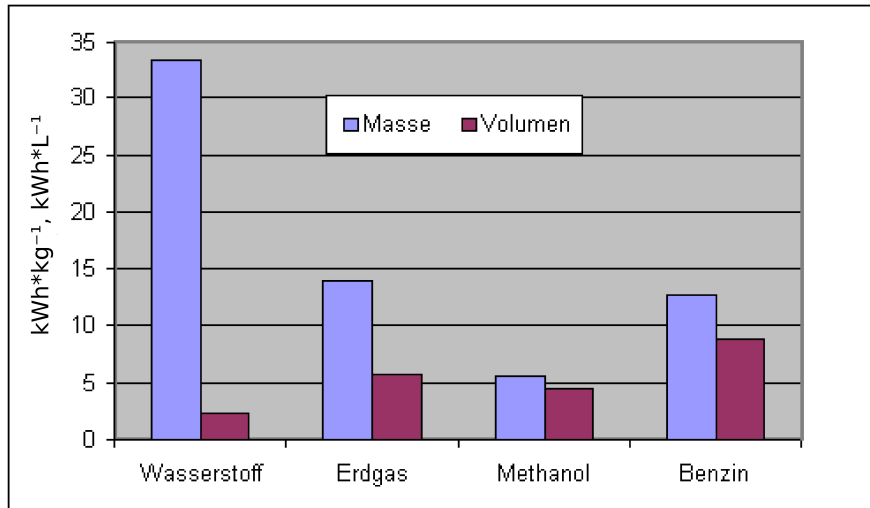
Jules Verne („Die geheimnisvolle Insel“ 1870)

1 Einleitung

Schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts erkannte Jules Verne die Bedeutung des Wasserstoffs als alternativen Energieträger. Damals war er in seinem Denken der Zeit weit voraus. Er und andere Vorreiter fanden wenig Gehör für die neue Technik, denn seit etwas mehr als einhundert Jahren, mit dem Beginn des industriellen Zeitalters, nutzt der Mensch verstärkt fossile Brennstoffe um chemisch gebundene Energie in Wärme und kinetische Energie umzuwandeln. Einen Großteil der Zeit geschah dies ohne Rücksicht auf die Folgen für die Umwelt. Erst seit einigen Jahrzehnten setzte in dieser Hinsicht ein Umdenken ein. Die Bedeutung der Suche nach alternativen Energieträgern und die Ausrichtung auf erneuerbare Energien in allen Belangen stieg zunehmend an. Dies gipfelte zuletzt in den Gesetzen zur Umstrukturierung der Energielandschaft in Deutschland. Neben dem Versuch die Gewinnung von elektrischem Strom auf erneuerbare Energien umzustellen, muss es ebenso Ziel sein nach alternativen Brennstoffen zu suchen. An dieser Stelle bietet sich vor allem Wasserstoff an. Noch vor wenigen Jahrzehnten galten die meisten fossilen Brennstoffe als sehr umweltfreundlich, da sie bei ihrer Verbrennung lediglich Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) emittieren. Mittlerweile ist bekannt, dass gerade Kohlenstoffdioxid eines der gefährlichsten Treibhausgase ist, und somit dessen Emissionen möglichst gering gehalten werden müssen um dem Klimawandel entgegen zu steuern. Außerdem ergibt sich hierbei das Problem der sich ständig verknappenden Rohstoffe und die damit in Verbindung stehenden starken Preissteigerungen am Markt. Wasserstoff hingegen verbrennt völlig "klimaneutral" (vgl. Reaktionsgleichungen 1.1 und 1.2). Hier entsteht lediglich molekulares Wasser. Außerdem handelt es sich um einen nahezu unbegrenzt verfügbaren Rohstoff, der komprimiert eine weit höhere Energiedichte aufweist als alle anderen fossilen Brennstoffe. So besitzt Wasserstoff eine massebezogene Energiedichte von $33 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$. Fossile Energieträger, zum Beispiel Diesel ($11 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$) oder Benzin ($12 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$), besitzen zu dieser Bezugsgröße weit niedrigere Werte. Lediglich die volumenbezogene Energiedichte ist bei kohlenstoffbasierten Energieträgern höher (siehe Abbildung 1.1). Dieser Fakt fällt aber nicht ins Gewicht, da Wasserstoff komprimiert gehandelt wird und somit der Volumenaspekt nicht betrachtet werden muss [AKK02].

Verbrennung von molekularem Wasserstoff



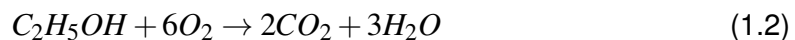


<http://www.user.tu-berlin.de/h.gevrek/ordner/ilse/Brennstoffzelle/images/MasseVolumenSpez.gif>

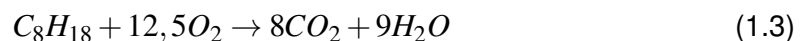
Abbildung 1.1: Energiedichte von Wasserstoff

Diese Abbildung verdeutlicht die Unterschiede von volumen- und massebezogener Energiedichte von Wasserstoff im Vergleich zu anderen Brennstoffen. Es wird deutlich, dass Wasserstoff die höchste massebezogene Energiedichte, sowie die niedrigste volumenbezogene Energiedichte aufweist.

Verbrennung von Ethanol



Verbrennung von Octan



Dies löst auch das Problem der Speicherung. Die meiste umweltfreundlich gewonnene Energie entsteht aus der Umsetzung natürlicher Umwelteigenschaften in elektrischen Strom. Dieser lässt sich aber mit heutigen Methoden noch nicht effizient über lange Zeit speichern. Die Verwendung von Wasserstoff löst dieses Problem.

Einzig die umweltfreundliche Darstellung von molekularem Wasserstoff stellt derzeit noch ein großes Problem dar. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Lösungsansatz hierzu und soll zeigen, dass die kontinuierliche Wasserstoffproduktion in Zukunft auch umweltschonend durch Mikroorganismen erfolgen kann.

2 Grundlagen

2.1 Wasserstoff

Wasserstoff ist das erste Element im Periodensystem und somit auch das leichteste. Das Atom besteht aus einem Proton, welches von einem Elektron umkreist wird. Der in dieser Form auf der Erde nur äußerst selten vorliegende Wasserstoff wird auch als naszierender Wasserstoff bezeichnet und ist sehr reaktiv. Reiner Wasserstoff liegt fast ausschließlich in molekularer Form vor. Hierbei teilen sich zwei Wasserstoffatome ein Elektronenpaar. Molekularer Wasserstoff ist zwar chemisch stabiler als das atomare Derivat, trotzdem ist die Substanz immer noch sehr reaktiv. Bestes Beispiel hierfür ist die Knallgasreaktion. Hierbei reagiert Sauerstoff mit Wasserstoff zu Wasser (siehe Reaktionsgleichung 1.1). Neben dem nicht-radioaktiven Wasserstoff mit einem Proton (^1H), auch Protium genannt, existieren noch zwei weitere radioaktive Isotope. Zum einem Wasserstoff mit einem Neutron und einem Proton (^2H), auch Deuterium genannt, zum anderem existiert Wasserstoff mit drei Kernteilchen (^3H), das sogenannte Tritium.

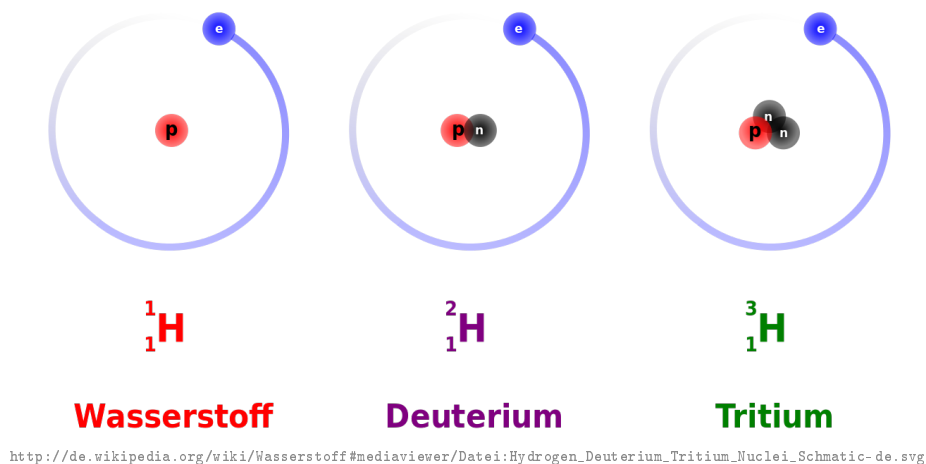


Abbildung 2.1: Wasserstoff - natürliche Isotope

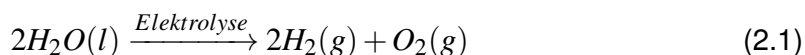
Diese Abbildung zeigt die drei natürlich vorkommenden Isotope des Wasserstoffs. Dies sind von links nach rechts: Protium, Deuterium und Tritium. Es ist erkennbar, dass Protium lediglich aus einem Proton besteht, welches von einem Elektron umkreist wird. Deuterium hingegen besitzt zusätzlich ein Neutron im Kern, Tritium besitzt zwei Neutronen extra.

2.2 Wasserstoff Darstellung

2.2.1 Elektrolyse

Eine Methode zur Wasserstoffgewinnung ist die Elektrolyse von Wasser. Diese Methode ist bereits seit langer Zeit bekannt, wird aber industriell selten verwendet. Allgemein ist die Elektrolyse, wie der Name schon andeutet, ein elektrochemisches Verfahren zur Spaltung von Wasser. Es werden zwei Elektroden in ein Wasserbad gegeben, welches zur Leitung des Stromes zusätzlich Elektrolyte enthalten sollte. Hierbei wird in großtechnischen Anlagen vor allem auf Kaliumhydroxid-Lösungen (KOH) gesetzt, da bei Verwendung von beispielsweise Kochsalz oder Salzsäure auch Chlorgas entstehen kann. Die Gesamtreaktion (siehe Reaktion 2.1 und Abbildung 2.2) lässt sich in zwei Teilreaktionen zerlegen. Die erste Reaktion findet an der Kathode statt (siehe Reaktion 2.2). Diese besitzt einen Elektronenüberschuss und ist somit in der Lage in Wasser gebundenen Wasserstoff zu reduzieren. Hierbei entstehen Hydroxidionen (OH^-), welche sich in Richtung Anode bewegen. Außerdem können Hydroniumionen (H_3O^+) in Wasserstoff und Wasser umgesetzt werden (siehe Reaktion 2.3). An der Anode herrscht ein Elektronenmangel. An dieser Stelle werden Hydroxidionen in Sauerstoff und Wasser umgewandelt, beziehungsweise wird der Sauerstoff aus Wasser oxidiert (siehe Reaktionen 2.4 und 2.5). In diesem Falle entstehen Hydroniumionen, welche sich dann in den Kathodenraum bewegen.

Gesamtreaktion



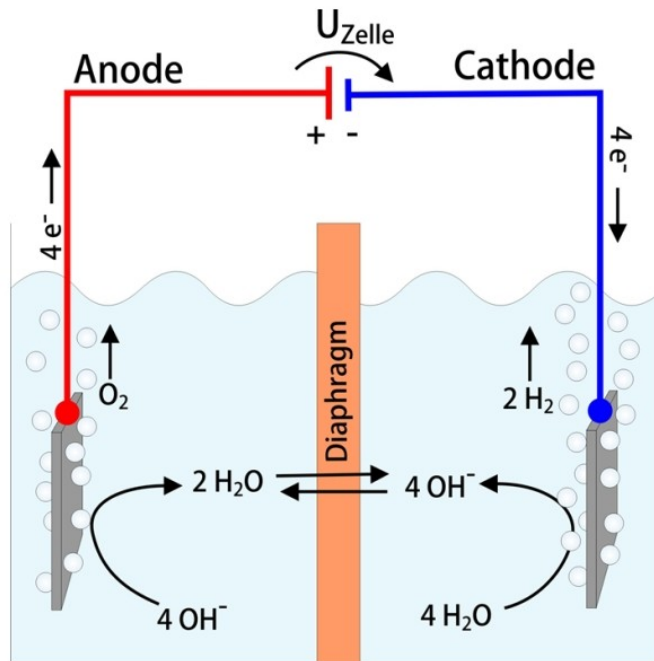
Kathodenreaktion



Anodenreaktion



Der Wirkungsgrad der ablaufenden Reaktionen liegt bei circa 70%. Es werden Wasserstoffbildungsraten von bis zu $730 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht.



http://www.ifam.fraunhofer.de/content/dam/ifam/de/images/dd/H2/Bildleiste_Elektrolyse_neu/010_elektrolyseschema.jpg

Abbildung 2.2: Wasserelektrolyse

Die Abbildung verdeutlicht den schematischen Aufbau einer Elektrolysezelle. Zu erkennen ist ebenfalls der Kreislauf der unterschiedlichen entstandenen Wasserspezies und deren Orientierung zu den entsprechenden Elektroden.

2.2.2 Dampfreformierung

Die Dampfreformierung stellt ein weiteres Verfahren zur Wasserstoffsynthese dar, welches aufgrund seiner hohen Ausbeuten häufig großtechnisch zur Anwendung kommt. Hierbei werden organische Verbindungen, insbesondere Methan (CH_4), Erdöl, und Erdgas, verwendet. Als Nebenprodukte entstehen bei der Reaktion Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Kohlenstoffmonoxid (CO) [Lina]. Werden langkettige Kohlenwasserstoffe eingesetzt, müssen diese erst in Methan umgewandelt werden. Dies findet in einem Prereformer bei Temperaturen von 450-500 °C und einem Druck von etwa 25-30 bar statt. Die eigentliche Wasserstofferzeugung aus Methan lässt sich in zwei Hauptprozessschritte unterteilen.

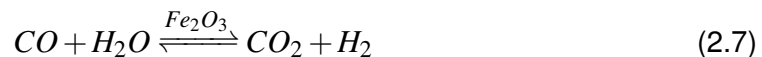
Hauptprozess der Reformierung Hier wird der organische Brennstoff bei Temperaturen von 800-900 °C und einem Druck von 25-30 bar unter Zugabe von Wasserdampf in Kohlenstoffmonoxid (CO) und Wasserstoff (H_2) umgesetzt (siehe Reaktion 2.6).

Prozess der Kohlenstoffmonoxideleminierung, oder auch Wassergas-Shift-Reaktion (siehe Reaktion 2.7) Hierbei wird das entstandene Kohlenstoffmonoxid mit heißem Wasserdampf versetzt und reagiert an einem Eisen(III)-oxid-Katalysator (Fe_2O_3) zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2). Die allgemeine Reaktion für alle Alkane ist unter der Gleichung 2.8 dargestellt. Anlagen für die Dampfreformierung erreichen Stoffumsätze von bis zu $120000 \text{ Nm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ [Lina].

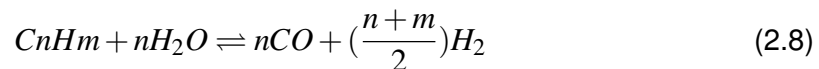
Dampfreformierung von Methan - Reaktion 1



Dampfreformierung - Wassergas-Shift Reaktion



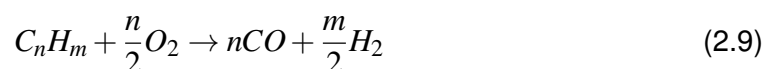
Dampfreformierung - Allgemeine Gleichung



2.2.3 Partielle Oxidation

Die partielle Oxidation verwendet ebenso wie die Dampfreformierung fossile Brennstoffe zur Gewinnung von Wasserstoff. Ihr Vorteil liegt darin, dass auch Feststoffe verwendet werden können wie zum Beispiel Steinkohle. Bei dem Verfahren wird das organische Material nicht-stöchiometrisch mit Sauerstoff verbrannt, wobei sowohl Kohlenstoffdioxid als auch Wasserstoff entstehen. Die allgemeine Reaktionsgleichung verdeutlicht diesen Sachverhalt. Es werden Produktionsraten von bis zu $200000 \text{ Nm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht [Linb].

Allgemeine Reaktionsgleichung zur partiellen Oxidation



¹ Die Einheit Nm^3 bezeichnet Normkubikmeter. Hierfür gilt die Festlegung nach DIN 1343: p=101325 bar, Gasfeuchte 0%, T=273,15 K

2.2.4 Kvæner-Verfahren

Das Kvæner-Verfahren wurde in den 1980er Jahren von einer norwegischen Firma entwickelt. Hierbei werden Kohlenwasserstoffe unter extremer Energiezufuhr zum Beispiel durch einen Plasmabrenner mit einer Temperatur von circa 1600 °C verbrannt. Dabei entsteht reiner Kohlenstoff (Aktivkohle) und Wasserstoff. Der Wirkungsgrad solcher Anlagen liegt bei nahezu 100% aufgrund der hochenergetischen Reaktionsprodukte. Beispielhaft hierfür ist eine Pilotanlage in Kanada, welche aus 1000 Nm³·h⁻¹ Erdgas und 2100 kW elektrischer Energie rund 500 kg·h⁻¹ Aktivkohle, 2000 Nm³·h⁻¹ Wasserstoff und Heißdampf mit einer Leistung von 1000 kW erzeugt [die].

Allgemeine Reaktionsgleichung - Kvæner-Verfahren



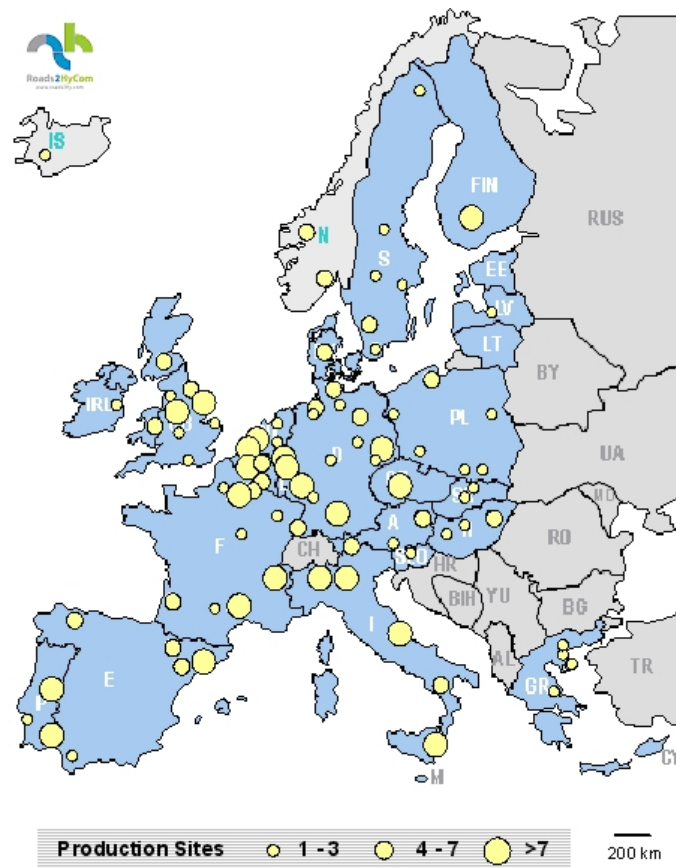
2.3 Wasserstoffwirtschaft

Viele Industriezweige benötigen Wasserstoff als Ausgangsstoff für ihre Produktion. Dar- aus resultierte ein Wasserstoffverbrauch von circa 61 Mrd. Nm³ im Jahr 2003. Davon wurden etwa 80% von lediglich zwei Industriezweigen verwendet. Zum einem circa 50% durch die raffinierende Industrie und zum anderem 32% durch die Ammoniaksynthese. Weitere 10% wurden von der Methanol verwertenden Industrie beziehungsweise der Metall verarbeitenden Industrie verbraucht. Dem entgegen steht eine jährliche geschätzte Produktion von rund 90 Mrd. Nm³. Davon werden 80 Mrd. Nm³ von Mitgliedern der EU gefördert. Hierzu zählen insbesondere Deutschland mit 22 Nm³, die Niederlande mit 10 Nm³ und mit etwa 5-7 Nm³ Großbritannien, Frankreich, Italien, Spanien und Belgien [Aac].

Neben den genannten wasserstoffverbrauchenden Industriezweigen soll in Zukunft vor allem auch elektrische Energie aus Wasserstoff erzeugt werden, sowohl großindustriell als auch für Privatanwender im PKW.

2.4 Brennstoffzelle

Für die Zukunft der erneuerbaren beziehungsweise klimaneutralen Energien war die Entwicklung der Brennstoffzelle besonders wichtig. Das erste funktionierende Produkt wurde im Jahre 1839 von Brite William Grove gebaut. Allerdings geriet die Technik



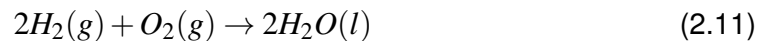
http://www.ika.rwth-aachen.de/r2h/images/1/1d/R2H_WP2_Production-Distribution.jpg

Abbildung 2.3: Wasserstoffproduktion in Europa

Die Abbildung verdeutlicht die Wasserstoffproduktionsstandorte auf dem eurasischen Kontinent. Dunkelblau eingefärbt sind die Mitgliedsstaaten der EU.

schnell in den Hintergrund, da nicht viel später der Dynamo durch Siemens vorgestellt wurde. Das Funktionsprinzip ist die Umkehrreaktion zur Wasserelektrolyse. Demzufolge entsteht bei der Reaktion von Wasserstoff und Sauerstoff in der Brennstoffzelle Wasser und elektrischer Strom. Dieses System ist somit komplett emissionsfrei in Hinblick auf klima- oder umweltschädliche Reaktionsprodukte. Der einfachste Aufbau besteht aus einer Platin- oder Palladiumelektrode getrennt durch eine Elektrolytmembran. An der Anode reagiert molekularer Wasserstoff entweder mit Hydroxidionen zu Wasser oder mit Wasser zu Hydroniumionen unter Abgabe von Elektronen (siehe Reaktionen 2.12 und 2.13). Sowohl Wasser als auch Hydroniumionen werden für die Kathodenreaktion benötigt. An der Kathode gelangen nun die Elektronen an und reagieren mit Sauerstoff und Wasser zu Hydroxidionen oder mit Hydroniumionen zu Wasser (siehe Reaktionen 2.14 und 2.15). Für die Gesamtreaktion bleibt letztlich Wasser übrig (siehe Reaktion 2.11).

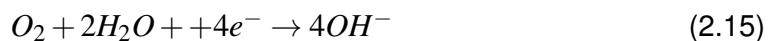
Gesamtreaktion - Brennstoffzelle



Anodenreaktion



Kathodenreaktion



Mittlerweile unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten von Brennstoffzellen. Die vorhergehend beschriebene gehört zu den PEMFC (Proton Exchange Membrane Fuel Cell). Eine einzelne dieser Zellen liefert ungefähr 1 V an Spannung, sodass für realistische Anwendungen mehrere dieser Zellen in Reihe geschaltet werden. Problematisch für die Kompaktheit der Systeme ist dies nicht, da die Zellen sehr klein und leicht sind, vor allem im Vergleich zu herkömmlichen Akkumulatoren. Daher bietet sich an dieser Stelle auch besonders der Einsatz in Kraftfahrzeugen an. Schematisch ist der Aufbau in Abbildung 2.4 dargestellt.

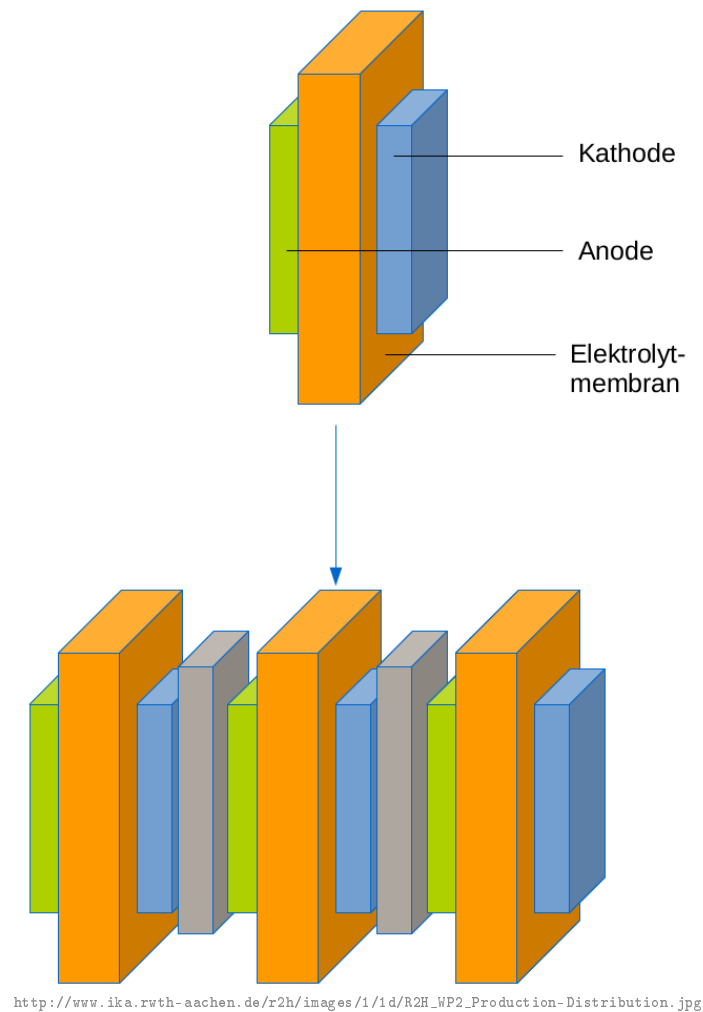
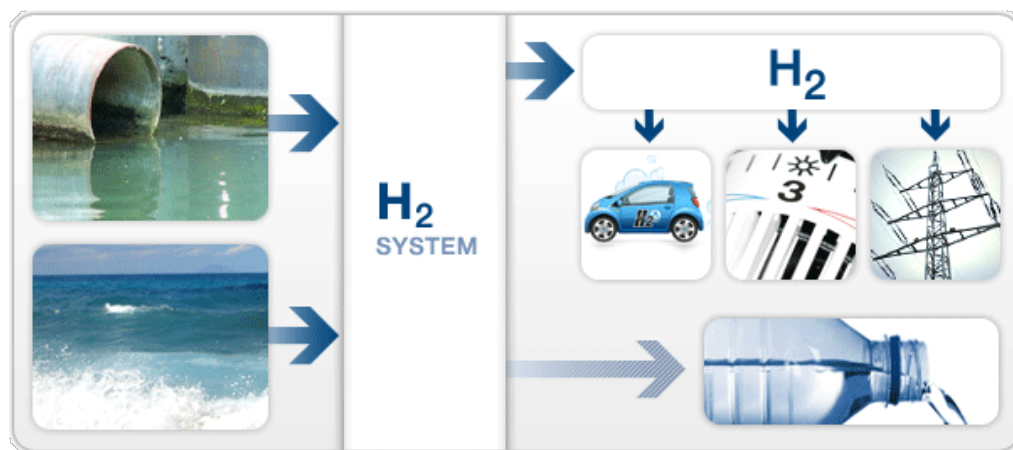


Abbildung 2.4: Brennstoffzelle - PEMFC - Schema

Hier dargestellt ist der schematische Aufbau einer PEMFC Brennstoffzelle. Der obere Teil zeigt eine einzelne Zelle, bestehend aus Anode (grün) und Kathode (blau) getrennt durch die Elektrolytmembran (orange). Mehrere dieser Zellen in Reihe geschaltet ergeben ein "Stack" (untere Abbildung).

Der große bedeutende Vorteil an Brennstoffzellen ist die Möglichkeit geschlossene Ressourcenkreisläufe zu schaffen. So wird im Falle von Wasserstoff folgendes Szenario in Betracht gezogen (siehe Abbildung 2.5):

1. Gewinnung von Wasserstoff aus Wasser
2. Verbrauch des Wasserstoffs in Fahrzeugen, zur Stromgewinnung und als Heizkraft
3. Zurückführung des entstandenen Wassers in den Kreislauf



<http://www.iwt-industry.ch/Wasserstoffgewinnung-H2-System,11.html>

Abbildung 2.5: Wasserstoffkreislauf

Diese Abbildung verdeutlicht den geschlossenen Ressourcenkreislauf am Beispiel von Wasserstoff.

2.5 Purpurbakterien

Neben der momentan genutzten Verfahren zur Wasserstoffherstellung wird zunehmend versucht auf biologische Systeme umzusteigen. Diese haben den entscheidenden Vorteil der Unabhängigkeit gegenüber fossilen Energieträgern. Für diese Aufgabe kommen unterschiedliche biologische Systeme in Betracht. An dieser Stelle sollen die im Zusammenhang mit dieser Arbeit verwendeten Organismen aus der Klasse der Purpurbakterien näher erläutert werden.

Die Klasse der Purpurbakterien (lat. *Rhodospirillales*) teilt sich in zwei Familien: die Unterfamilie der Schwefelpurpurbakterien (lat. *Chromatiaceae* beziehungsweise *Ectothiorhodospiraceae*) und die der schwefelfreien Purpurbakterien (lat. *Rhodospirillaceae*) kurz: PNS². Die Bakterien fallen durch eine hohe Bandbreite an unterschiedlichen Färbungen auf. Diese reichen von braun über orange bis hin zu rot und grün. Hervorgerufen

² engl.: Purple Non-Sulfur Bacteria

wird dies durch Carotinoide beziehungsweise im Falle einer Grünfärbung durch Bacteriochlorophyll. Hieraus ergibt sich bereits eine weitere Eigenschaft der Organismen. Alle Vertreter dieser Klasse sind zur Photosynthese befähigt. Der Photosyntheseapparat ist dabei zumeist in Vesikeln, Tubi oder lamellenartigen Einstülpungen der inneren Plasmamembran lokalisiert [VJ99]. Die Ausprägung hängt stark vom jeweiligen Lichteinfall und der Exposition zu einer aeroben Umgebung ab. Der Photosyntheseapparat wird nur unter Sauerstoffabschluss ausgebildet. Ebenso verringert ein zu starker Lichteinfall die Menge an Photosynthesepartikeln in den Zellen, so kann es aber bei optimaler Lichtintensität zum kompletten Ausfüllen der Zelle mit Photosynthesevesikeln kommen. Als Kohlenstoffquelle können nahezu alle einfachen organischen Substrate verwendet werden. Hierzu zählen insbesondere Malat, Succinat und Lactat. Reduktionsäquivalente stammen bei Schwefelpurpurbakterien hauptsächlich von Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff. Des Weiteren sind die meisten Stämme zur anoxygenen Gärung fähig. Einigen Organismen ist es möglich komplett photolithotroph zu leben. Hierbei dient molekularer Wasserstoff sowie zweiwertige Eisenverbindungen als Elektronendonator. Genetisch spalten sich die Purpurbakterien in drei Zweige auf, welche den *Proteobacteria* zugeordnet werden. Diese teilen sich in die α - und β -Unterklasse der schwefelfreien Purpurbakterien und die γ -Klasse der Proteobakterien (siehe Abbildung 2.6) [JD].

Der für die Anfertigung dieser Arbeit verwendete Organismus *Rhodobacter sphaeroides* gehört zu den α 3-Proteobakterien. Morphologisch ist der Organismus etwa 0,1 bis 0,5 μm groß und monopolar begeißelt. Die hauptsächlichen Vorkommen finden sich in Seesedimenten bis zu einer Wassertiefe von etwa 10 m. Die Vermehrung erfolgt asexuell, durch einfache Zellteilung. Der Photosyntheseapparat ist in vesikuläre Partikel verpackt, wobei es sich bei den Pigmenten um Bacteriochlorophyll a und unterschiedliche Carotenoide handelt. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Proteobakterien enthalten die Organismen einen großen Cytochrom-c2-Komplex. Als Wachstumsfaktoren werden unterschiedliche Vitamine benötigt, unter anderem Biotin und Thiamin [ITP84]. Er besitzt ein sehr komplexes Genom, bestehend aus zwei Chromosomen und fünf endogenen Plasmiden und eine ebenso komplexe metabolische Vielfalt [CZFK07].

2.6 Photosynthese

Einige Organismen sind in der Lage aus energiearmen anorganischen Stoffen, so zum Beispiel Kohlenstoffdioxid und Wasser, energiereiche organische Stoffe, zum Beispiel Glukose, zu synthetisieren. Die Energie, welche hierfür nötig ist, beziehen sie aus Licht. Deshalb wird dieser Synthesevorgang auch als Photosynthese bezeichnet. Vor allem grüne Pflanzen und Grünalgen sowie Cyanobakterien sind zu dieser Art der photo-

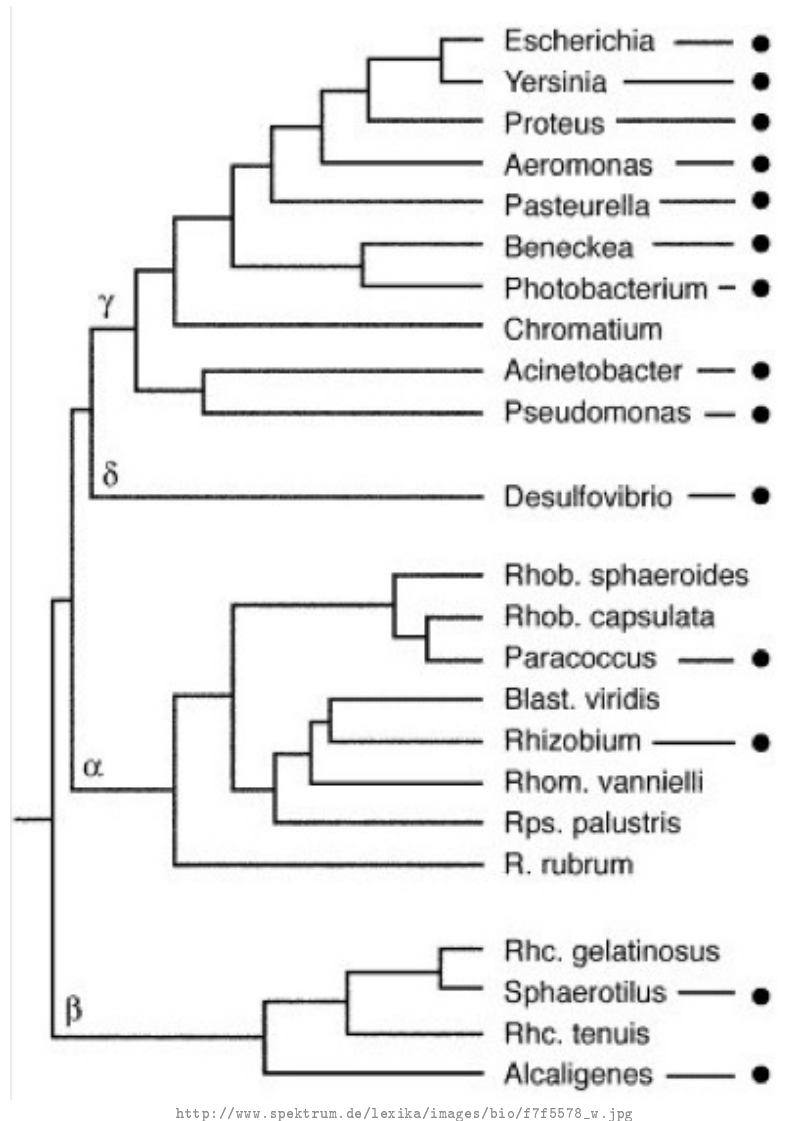
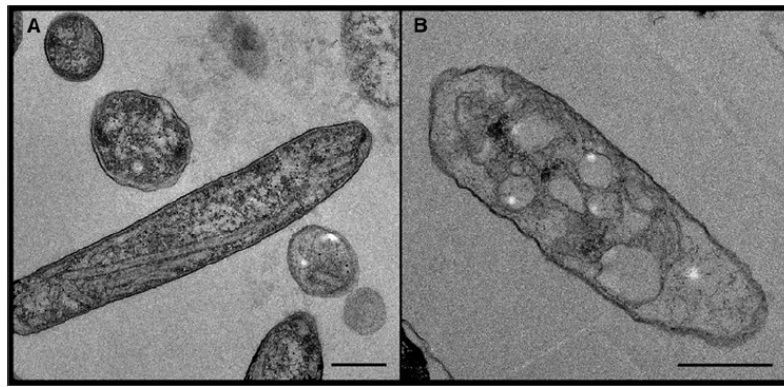


Abbildung 2.6: Kladogramm - Proteobakterien

Im abgebildeten Kladogramm werden die Verwandtschafts- und Evolutionsbeziehungen zwischen den einzelnen Phylia der Proteobakterien verdeutlicht. Es ist erkennbar, dass das β -Phylum einen eigenständigen Zweig bildet. Daraus hervorgegangen sind α -Proteobakterien, aus denen sich wiederum das γ - und δ -Phylum abspaltet. Mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet sind nicht-phototrophe Vertreter.



Siebert et. al. 2004

Abbildung 2.7: *Rhodobacter sphaeroides*

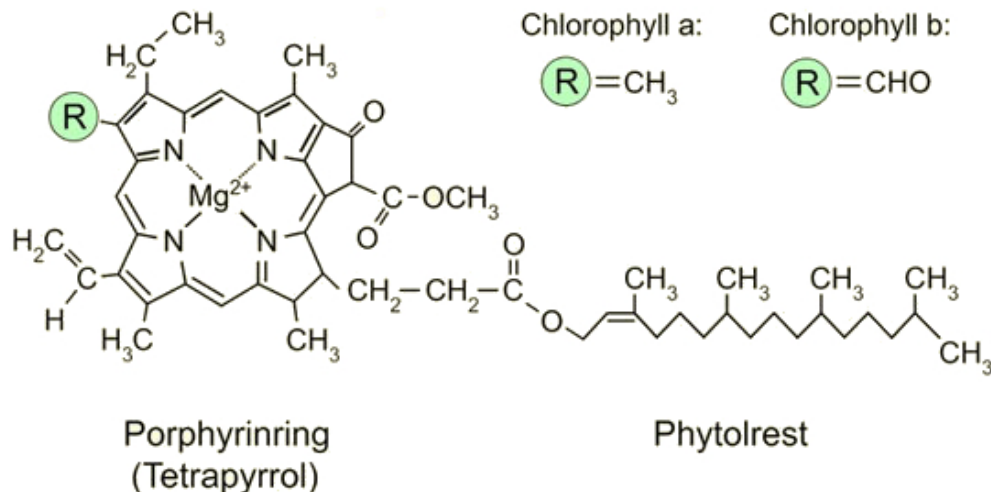
Diese Abbildung zeigt den Organismus *Rhodobacter sphaeroides* DD13/G1 in einer 0,1µm Skalierung.

autotrophen Lebensweise fähig. Neben diesem Metabolismus existiert auch die Möglichkeit organische Verbindungen, zum Beispiel organische Säuren, als Kohlenstoffquelle zu verwenden. Organismen mit dieser Lebensweise werden als photoheterotroph bezeichnet. Dies trifft auf die meisten phototroph lebenden Bakterien zu, da deren Photosynthesemechanismus oft nicht die Komplexität grüner Pflanzen oder Algen erreicht [NAC09].

2.6.1 Photosynthese bei grünen Pflanzen und Algen - direkte Photolyse

Die oxygene Photosynthese basiert auf der Zusammenarbeit zweier Photosysteme. Diese sind das Photosystem I mit einem P700 Reaktionszentrum, sowie das Photosystem II mit einem P680 Reaktionszentrum. Bei den Photosystemen handelt es sich um den Zusammenschluss von photosynthetisch aktiven Pigmenten gebündelt um ein spezialisiertes aktives Reaktionsmolekül mit einer bestimmten optimalen Lichtabsorptionswellenlänge [AKK02]. Zu den photosynthetisch aktiven Molekülen zählen bei den grünen Pflanzen und Algen vor allem Chlorophyll sowie unterschiedliche Xanthophylle, Luteine und Carotinoide.

Chlorophyll stellt hierbei den wichtigsten Bestandteil dar. Diese Moleküle ähneln mit ihrer planaren, polyzyklischen Struktur stark dem Protoporphyrin des Hämoglobinmoleküls. Sie unterscheiden sich lediglich im Zentralatom, wobei es sich beim Chlorophyll um ein Magnesiumion, beim Protoporphyrin um ein Eisen(II)-ion handelt. Vier Chlorophyllliganden koordinieren sich um ein Magnesiumion. Die Bindung erfolgt über ein



http://biologywiki.apps01.yorku.ca/images/e/e9/Pigment_spectra.png

Abbildung 2.8: Grundstruktur eines Chlorophyllmoleküls

Die Abbildung zeigt die Grundstruktur eines Chlorophyllmoleküls. Die Substituenten R1 und R2 korrespondieren mit den Chlorophylltypen a und b.

Stickstoffatom. Des Weiteren ist über eine Veresterung eine Phytolseitenkette am Ring IV des Chlorophylls gebunden. Zusätzlich existiert ein weiterer fünfgliedriger Ring. Diese heterozyklischen Ringsysteme bilden eine prägnante Polyenstruktur aus. Der häufige Wechsel zwischen Doppel- und Einfachbindungen im Kohlestoffgerüst verleiht dem Molekül sowohl eine starke chemische Stabilität als auch die Fähigkeit verstärkt Licht im sichtbaren Bereich zu absorbieren. Neben dieser allgemeinen Struktur existieren innerhalb der Chlorophylle unterschiedliche Species, welche sich hauptsächlich durch ihre Substituenten am C3-, C7-, C8-, und C17-Rest sowie der Bindung zwischen dem C17- und C18-Kohlenstoff unterscheiden (siehe Abbildung 2.8). Hierdurch wird eine starke Variabilität im Absorptionsverhalten der Moleküle erreicht, sodass nahezu das gesamte Lichtspektrum eingefangen werden kann (siehe Abbildung 2.9).

Chlorophylle sind über Proteinkomplexe mit weiteren Pigmenten verknüpft. Diese Pigmentcluster werden als Lichtsammelkomplexe bezeichnet. So besteht beispielsweise ein Lichtsammelkomplex der Klasse 2 aus sieben Chlorophyll a, fünf Chlorophyll b, und zwei Lutein Molekülen (siehe Abbildung 2.10) [DLN11]. Diese Komplexe sind bei einfachen Lebensformen wie Cyanobakterien an die Thylakoide der Zellmembran gebunden. Bei Algen und Pflanzen findet die Photosynthese in eigenen Organellen, den Chloroplasten, statt. Diese besitzen eine Doppelmembran, wovon die Äußere permeabel für Ionen und niedermolekulare Stoffe ist. Die innere Membran umschließt die Grana. Hierbei handelt es sich um flache gestapelte Vesikel, an deren Membran die Photosynthesepartikel angeheftet sind (siehe Abbildung 2.11) [NAC09]. Luteine, Xanthophylle und

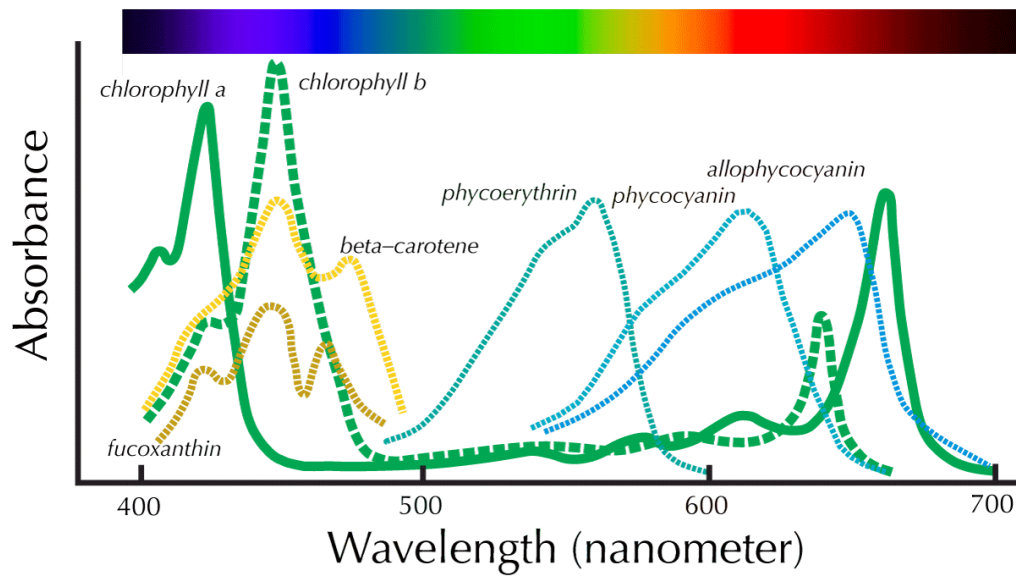


Abbildung 2.9: Absorptionsspektren unterschiedlicher Photosynthesepigmente

Das Diagramm verdeutlicht die unterschiedlichen Absorptionsspektren der einzelnen Photosynthesepigmente. Hierbei ist sehr gut zu erkennen, wie stark sich die einzelnen Species untereinander ergänzen und somit das nahezu komplette Sonnenlichtspektrum nutzen können.

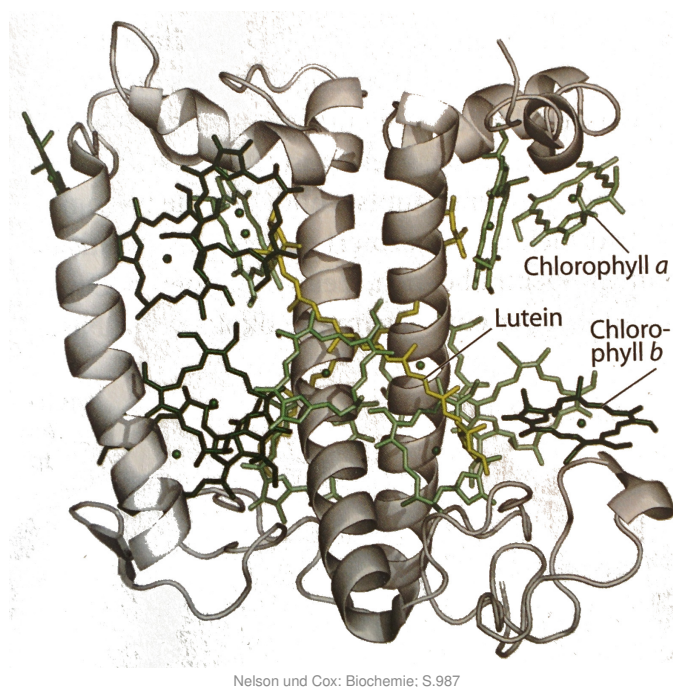


Abbildung 2.10: Aufbau des Lichtsammelkomplexes II

Es wird die Struktur des LHCII dargestellt. Zu sehen sind die hellgrünen Chlorophyll a, die dunkelgrünen Chlorophyll b und die gelben Lutein Moleküle. Diese sind mit einem Proteinkomplex assoziiert (grau), welcher 3 α -helikale Transmembranhelices zur Verankerung in der Thylakoidmembran aufweist.

Carotinoide sind neben den Chlorophyllen ebenso Photosynthetisch aktiv und oftmals ein Grundbestandteil der Antennenpigmente. Die Farbstoffe werden auch als akzessorische Pigmente bezeichnet, deren Farbvielfalt von Gelb über Rot bis hin zu Violett reicht. Im Gegensatz zu den Chlorophyllen bilden sie allerdings kein Reaktionszentrum aus.

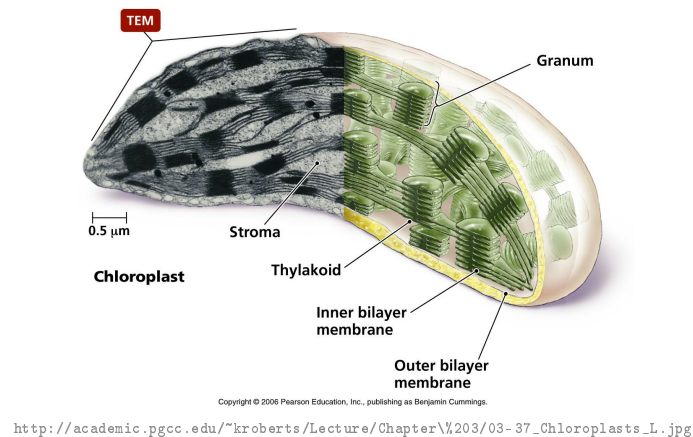
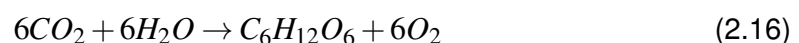


Abbildung 2.11: Chloroplast - Schema

Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Chloroplasten. Gut zu erkennen sind die Membranstapel (Grana) im Inneren des Organells.

Mit dem Wissen über die Strukturelemente der Photosynthese soll nun der eigentliche Ablauf erläutert werden. Die Photosynthesereaktion lässt sich in zwei Teilreaktionen untergliedern: zum einem die Lichtreaktion und zum anderem die Dunkelreaktion. Bei der Lichtreaktion wird Wasser photolytisch gespalten und es wird Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) und NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphospaht) umgesetzt. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht molekularer Sauerstoff. In der zweiten Reaktion, die auch als Dunkelreaktion oder Calvin-Benson-Cyklus bekannt ist, wird NADPH und ATP verbraucht um aus Kohlenstoffdioxid Glukose beziehungsweise Glyceraldehyde 3-phosphat (Triose P) aufzubauen. Triose P ist der Ausgangsstoff für alle weiteren organischen Metabolite eines Lebewesens, ausgehend von Zuckern über Aminosäuren bis hin zu Fetten und Fettsäuren [AKK02]. Die Bruttoreaktionsgleichung für die Photosynthese ist dabei die folgende:

Bruttoreaktionsgleichung - Photosynthese zur Produktion von Glucose



Zunächst wird das aus zwei Chlorophyll-a-Molekülen bestehende Reaktionszentrum

P680 des Photosystems II durch Lichteinfall angeregt. Hierfür ist Licht der Wellenlänge $\leq 680\text{nm}$ nötig. Dabei werden zwei Elektronen aus dem Reaktionszentrum auf ein höheres Energieniveau angehoben und an einen entsprechenden Akzeptor abgegeben. Daraus resultiert eine Elektronenlücke im P680 Reaktionszentrum des Photosystems II, welches dadurch ein enorm starkes Oxidationspotential entwickelt. Dieses Potential ist so groß, dass Wasser in Protonen und Sauerstoff gespalten wird um die entstandene Elektronenlücke zu schließen. Die Elektronen aus dem Photosystem II werden zunächst auf einen Plastochinonkomplex, danach über Cytochrom-bf₆ an das oxidierte P700 Reaktionszentrum des Photosystems I übergeben. Die Protonen wiederum gehen ins Stroma über und reduzieren dort einen Plastochinonkomplex. Dieser diffundiert durch die Thylakoidmembran und übergibt Elektronen über das Cytochrom-bf₆ an Plastocyanin, welches letztlich das oxidierte P700 Reaktionszentrum reduziert. Beim Elektronenübergang von Plastochinon auf das Cytochrom-bf₆ wird ATP gebildet. Durch weiteren Lichteinfall wird auch das P700 Reaktionszentrum oxidiert. Die Elektronen gehen hierbei auf eine Elektronentransportkette über, deren zentraler Bestandteil durch einen Ferredoxin-Komplex darstellt wird. Hierbei wird durch das Enzym Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase die Oxidation des Ferredoxins durch Reduktion von NADP⁺ zu NADPH katalysiert. Während der Reaktion bildet sich ein extrem starker Protonengradient an der Thylakoidmembran aus. Dieser ist die Triebkraft für die zyklische Phosphorylierung von ADP (Adenosindiphosphat) zu ATP durch das Membranprotein ATP-Synthase [NAC09] [AKK02]. Dieser metabolische Weg wird in Abbildung 2.12 unter Weg **A** deutlich. Unter besonderen Umständen ist es den Organismen auch möglich Wasserstoff zu synthetisieren. Hierfür müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- strikt anaerob
- niedriger H₂ Partialdruck
- Lichteinfluss
- Überschuss an reduzierten NADP⁺

Unter diesen Umständen wird der Stoffwechselweg **B** in Abbildung 2.12 eingeschlagen und überschüssige Elektronen werden vom Ferredoxin an die Hydrogenase abgegeben. Diese wiederum reduziert nun Protonen zu molekularem Wasserstoff [AKK02].

2.6.2 Photosynthese bei PNS

Im Gegensatz zu Pflanzen und Algen sind die Photosyntheseapparate von Bakterien einfacher aufgebaut. Sie besitzen lediglich ein Reaktionszentrum und sind im allgemeinen nicht in der Lage Wasser photolytisch zu spalten. Dies liegt an der mangelnden oxi-

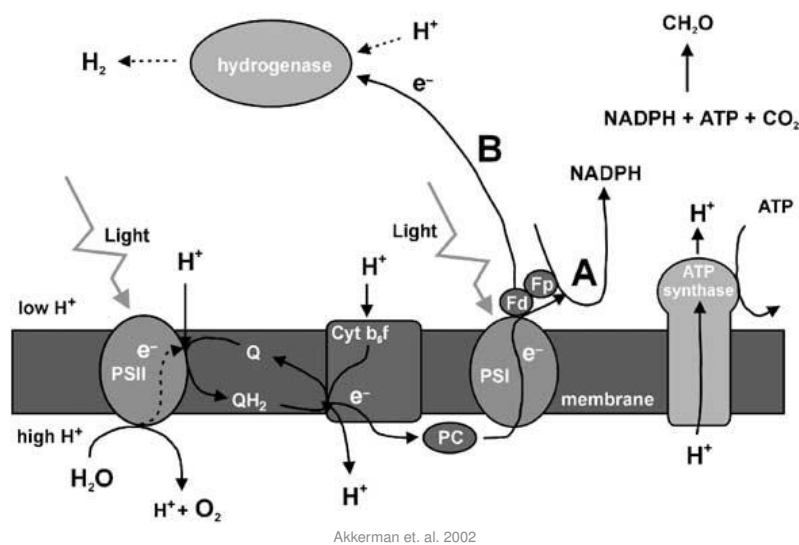
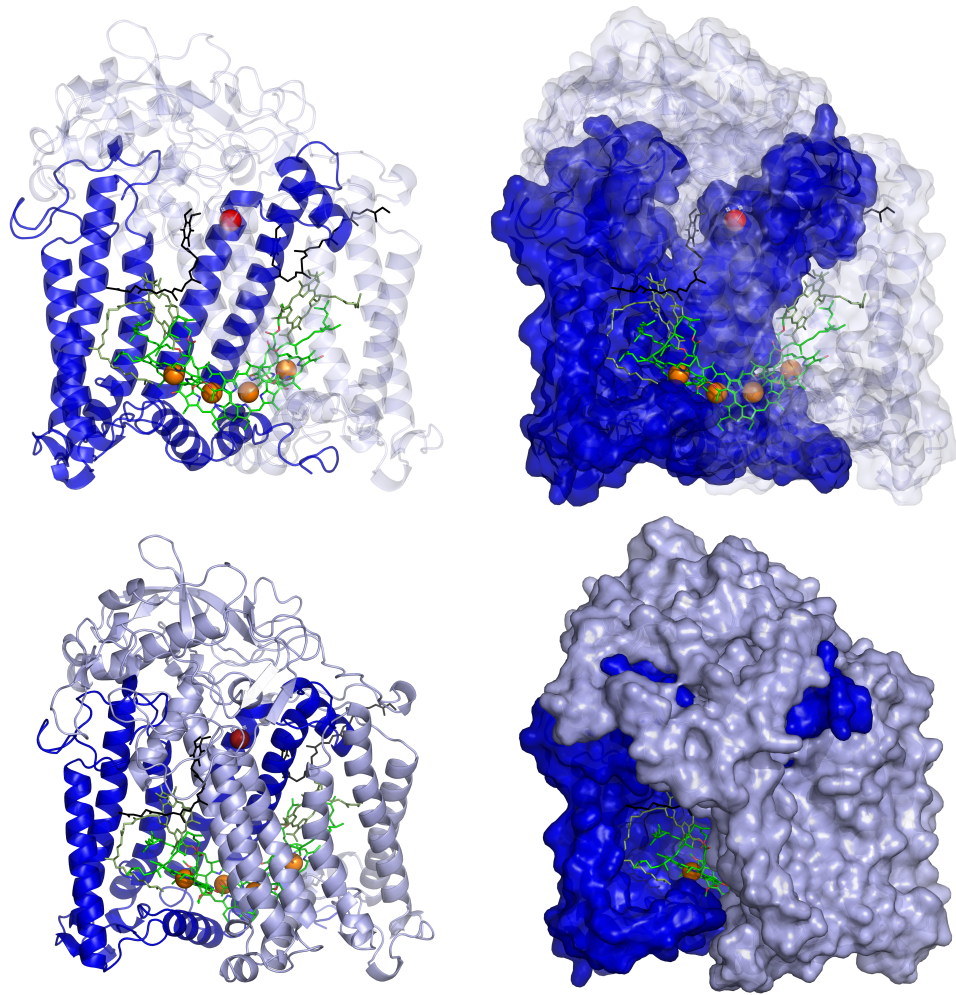


Abbildung 2.12: Photosynthese - Schema

Diese Abbildung zeigt den schematischen Ablauf der Photosynthese bei grünen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien. Erkennbar sind die Membranproteinkomplexe der Photosysteme I und II sowie die ATP-Synthase. Des Weiteren ist der Protonenkonzentrationsgradient von Stroma (niedrige H^+ Konzentration) und Lumen angezeigt. Unter **A** ist der normale Weg der Photosynthese aufgezeigt. An dieser Stelle werden die Reduktionsäquivalente und Energieäquivalente im Calvin-Zyklus verbraucht. Weg **B** zeigt einen alternativen Weg der Elektronen, sollte der metabolische Weg **A** nicht verfügbar sein. Hier werden die aus Photosystem I ausgelösten Elektronen über Ferredoxin an eine Hydrogenase weiter gereicht und zur Reduktion von Protonen genutzt. Dies ist eine Möglichkeit der biologischen Wasserstoffsynthese. Hierzu muss aber das Photosystem II deaktiviert sein.

dativen Kraft des Photosystems. Aus diesem Grund dienen ihnen zumeist organische Säuren als Elektronendonatoren für den Photosyntheseprozess. Die genannten Photosysteme und Reaktionszentren unterscheiden sich von denen grüner Pflanzen sowohl in den Absorptionsmaxima als auch im molekularem Aufbau, resultierend aus unterschiedlichen Photopigmenten. Diese sind im Falle von PNS beziehungsweise phototrophen Bakterien insbesondere Bakteriochlorophyll und Phäophytin. Das Phäophytinmolekül weist hierbei eine ähnliche Struktur wie Chlorophyll auf, besitzt aber kein zentrales Magnesiumion [DLN11]. Der verwendete Organismus *Rhodobacter sphaeroides* besitzt als Photosyntheseapparat drei transmembrane Proteinkomplexe. Dabei handelt es sich um Lichtsammelkomplexe, das Reaktionszentrum sowie den Cytochrom bc_1 -Komplex. Das Reaktionszentrum setzt sich aus drei transmembranen Proteinen, der L-, H-, und M-Kette zusammen. Hierbei ist lediglich die L-Kette photosynthetisch aktiv. Im Inneren des Proteinkomplexes befinden sich vier Bakteriochlorophylle, zwei Phäophytione und zwei Ubichinone. Hierbei sind zwei Chlorophyllmoleküle und beide Phäophytinmoleküle an die L-Kette gebunden und bedingen somit ihre photosynthetische Aktivität (siehe Abbildung) [Sto97] [VJ99]. *Rhodobacter sphaeroides* besitzt zwei unterschiedliche Lichtsammelkomplexe (LHC³ I und LHC II). Es wurde beobachtet, dass die Ausbildung des LHC II sowohl stark von der Sauerstoffsättigung als auch von der Lichtintensität abhängt. LHC I hingegen wird in einem festen stöchiometrischen Verhältnis zum Reaktionszentrum bereitgestellt. Wird ein LHC durch Lichteinfall angeregt, so wird die Energie gestaffelt an das Reaktionszentrum weitergereicht und löst ein Elektron aus dem zentralen Bakteriochlorophylldimer. Dieses geht auf ein Phäophytinmolekül über und wird schließlich an ein membrangängiges Chinon abgegeben. Dieses reicht das Elektron an ein weiteres Ubichinon weiter und reduziert dieses. Dieser Vorgang wiederholt sich zweimal, sodass am Ende ein doppelt reduziertes Ubichinon vorliegt. Im nächsten Schritt oxidiert das Ubichinon durch die Aufnahme zweier Protonen aus dem Stroma und löst sich vom Reaktionszentrum. Der Elektronenkreislauf schließt sich mit der Oxidation des Chinols durch Cytochrom c_2 katalysiert über ein Eisen-Schwefel-Cluster [Fe_2S_2] des Cytochrom- bc_1 Komplexes. Hierbei gehen zwei Protonen in das Cytoplasma über. Der zyklische Elektronentransfer, sowie die Ausprägung eines Protonengradienten zwischen Cytoplasma und Periplasma wirken als Triebkraft für die zyklische ATP-Synthese und Gewinnung von Reduktionsäquivalenten [VJ99] [DLN11] [AKK02]. Zusätzliche Energie in Form von ATP wird genutzt um Elektronen über Ferredoxin an eine Nitrogenase weiter zu reichen. Diese fixiert Stickstoff in Form von Ammonium (NH_4^+) unter ATP-Verbrauch. In Abwesenheit von Stickstoff und Sauerstoff und einem Überschuss an Energie (sowohl in Form von Elektronen als auch ATP) beginnt die Nitrogenase Wasserstoff aus Protonen zu bilden [AKK02].

³ engl.: *light harvesting complex*



PDB:1AIJ Hellwig 2014

Abbildung 2.13: Aufbau des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides*

Dargestellt ist der Proteinkomplex des Photoreaktionszentrums aus *Rhodobacter sphaeroides* parallel zur Membran. Dunkelblau ist jeweils die photosynthetisch aktive L-Kette, hellblau die Struktur stützende H- und M-Kette. Außerdem sind die im unteren Bereich an die L-Kette gebundenen Bakteriochlorophyllmoleküle zu erkennen (hellgrün) und zusammen mit ihren Magnesiumzentrationen (orange Sphären). Darüber befinden sich die korrespondierenden Phäophytinmoleküle (dunkelgrün), sowie zwei Ubichione (schwarz) und das zentrale Eisen(II)-ion (rote Sphäre). Die linken Abbildungen verdeutlichen die Ausbildung transmembraner Sekundärstrukturelemente (Helices), wobei im oberen Bild zur besseren Erkennbarkeit sowohl die H-, als auch die M-Kette transparent erscheinen. Die rechten Abbildungen verdeutlichen die Kompaktheit des Proteinkomplexes. Hierbei sind in der oberen Abbildung ebenfalls die H- und M-Kette transparent.

2.6.3 Enzyme zur Wasserstoffproduktion

Die biogene Wasserstoffproduktion wird vor allem durch zwei Enzyme katalysiert. Bei grünen Pflanzen und Cyanobakterien sind dies die Hydrogenasen, bei Purpurbakterien die Nitrogenasen. Beide Enzyme benötigen besondere Reaktionsbedingungen um letztlich aus Protonen Wasserstoff zu generieren. Diese Reaktionswege stellen zumeist „Notfallwege“ zum Recycling von Überschusselektronen in den Photosystemen dar. Die unterschiedlichen Nitro- und Hydrogenasen sollen im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden [SMKI13].

Hydrogenasen

Hydrogenasen stellen eine breite Klasse von Enzymen dar, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihren katalysierten Reaktionen unterscheiden. Hydrogenasen tragen die EC-Nummer 1.12.7.2. Hieraus lässt sich ableiten, dass sie zu den Oxidoreduktasen gehören und Wasserstoff als Donator sowie ein Eisen-Schwefelcluster als Akzeptor verwenden [TBa]. Strukturelle Unterschiede liegen hauptsächlich im aktiven Zentrum der Enzyme, in Form unterschiedlicher metallischer Co-Faktoren, vor. Man unterscheidet hier in Eisen-Eisen- ([FeFe]) und Nickel-Eisen- ([NiFe]) Hydrogenasen (siehe Abbildung 2.14). Des Weiteren werden sie nach ihrer katalysierten Reaktion unterschieden. Es existieren sowohl bidirektionale Hydrogenasen als auch sogenannte uptake Hydrogenasen. Bidirektionale Hydrogenasen katalysieren hierbei beide Wege der Reaktion 2.17, uptake Hydrogenasen hingegen lediglich die Spaltung von Wasserstoff in Protonen und Elektronen, welche letztlich dem Chinonpool wieder zugeführt werden. Uptake Hydrogenasen finden sich vor allem in Purpurbakterien und wirken hier antagonistisch zur wasserstoffproduzierenden Nitrogenase [SMKI13].

Katalysierte Reaktion der Hydrogenasen



[FeFe]-Hydrogenasen Eisen-Eisen-Hydrogenasen zählen zu den bidirektionalen Hydrogenasen und sind die Triebkraft zur Wasserstoffproduktion in grünen Algen. Hierzu muss neben der exprimierten Hydrogenase und einem Überschuss an Elektronen im Photosystem I auch ein ausgeprägter Pool an Ferredoxin/Flavodoxinkomplexen vorhanden sein. Zusätzlich reagiert das aktive Zentrum der Hydrogenase sehr empfindlich auf Sauerstoff und wird in Zusammenhang damit zerstört. Dies hat letztlich den Abbau des

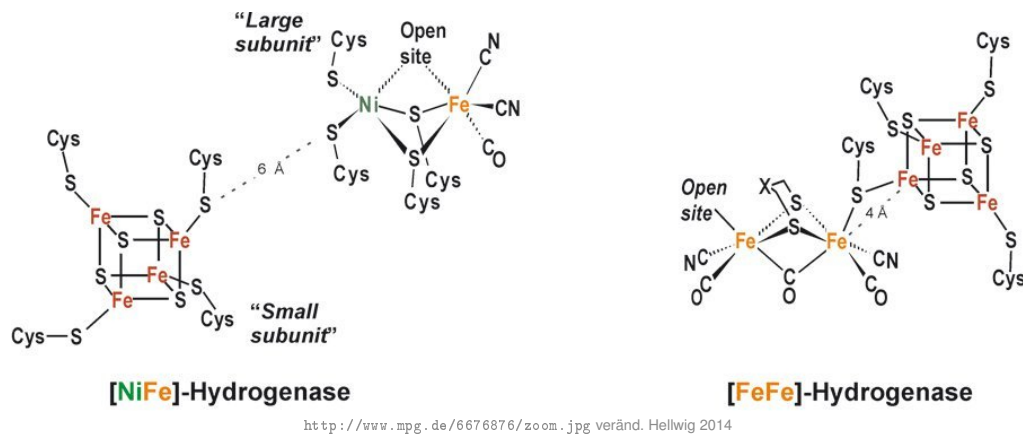


Abbildung 2.14: Aktive Zentren der Hydrogenasen

Diese Abbildung zeigt den Aufbau der anorganischen aktiven Zentren beider Hydrogenasespecies. Es ist erkennbar, dass bei beiden Hydrogenasen zusätzlich zum aktiven Zentrum ein Eisen-Schwefel-Cluster involviert ist. Außerdem wird deutlich, dass die [NiFe]-Hydrogenase aus zwei Untereinheiten besteht, wobei die kleine Untereinheit das [NiFe]-Zentrum beherbergt.

Enzyms zur Folge. Da bei grünen Algen im Laufe der Photosynthese Sauerstoff entsteht, ist im Normalfall keine Wasserstoffproduktion möglich. Hierfür muss entweder entstehender Sauerstoff sofort abgeführt, oder das Photosystem II deaktiviert werden. Für eine erhöhte Wasserstoffausbeute ist zusätzlich ein niedriger Wasserstoffpartialdruck notwendig, da die Hydrogenase sonst sofort die Rückreaktion katalysiert [SM-KI13]. Das Eisen-Eisen-Cluster der [FeFe]-Hydrogenase ist hierbei über einen Cyanid-Methylether-Komplex durch polare Wechselwirkungen fest im Protein gebunden. Die Bindung findet über den Stickstoff des Cyanids in Wechselwirkung mit dem Glutaminsäurerest 325 beziehungsweise über Wechselwirkungen zwischen Cyanid mit Serin 232 und Lysin 258 statt (siehe Abbildung 2.14) [NFC12].

[NiFe]-Hydrogenasen Diese Art der Hydrogenasen kommt insbesondere in photosynthetisch aktiven Bakterien vor. Hierbei existieren drei verschiedene Unterarten, welche sich in ihrer Funktion deutlich unterscheiden. Die bidirektionale Hydrogenase realisiert die Reaktion 2.17 in beide Richtungen. Als Elektronenquelle dient hierbei $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ beziehungsweise $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. Des Weiteren existiert die bereits genannte uptake-Hydrogenase, welche die Reaktion 2.17 nur in Richtung der Wasserstoffspaltung realisiert. Diese Art der Hydrogenasen ist auch Bestandteil des Proteoms von *Rhodobacter sphaeroides* und wirkt an dieser Stelle negativ auf die Wasserstoffausbeute. Letztlich existiert noch die Wasserstoff-Sensorische-Hydrogenase. Dieses Enzym ist nicht direkt an Reaktionen beteiligt, wirkt aber induzierend auf die Gene der beiden anderen Hydrogenasen. Hieraus geht hervor, dass sich lediglich die bidirektionale

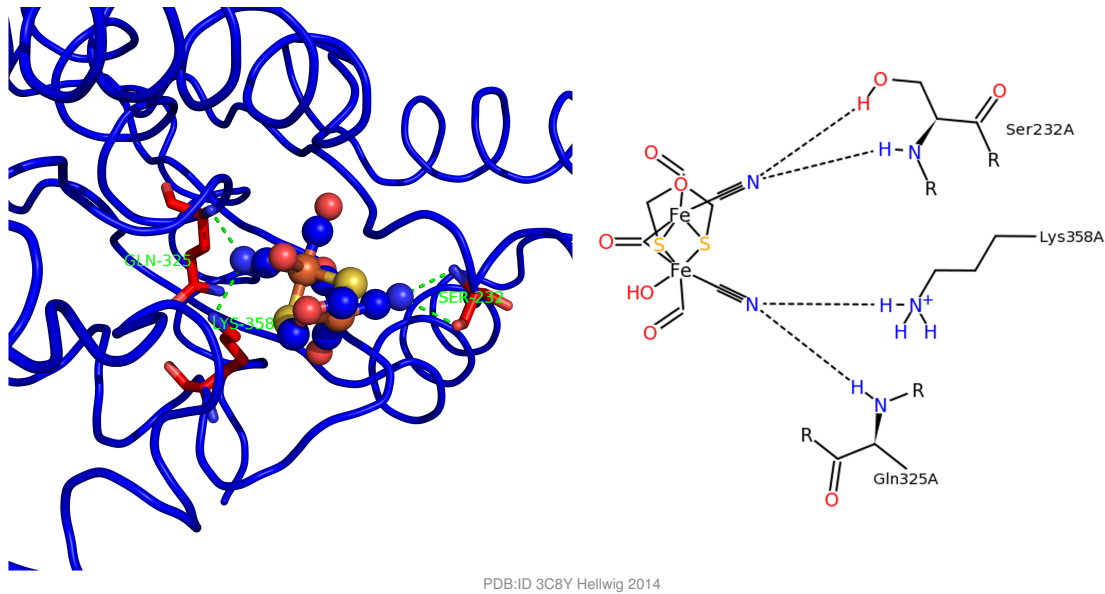


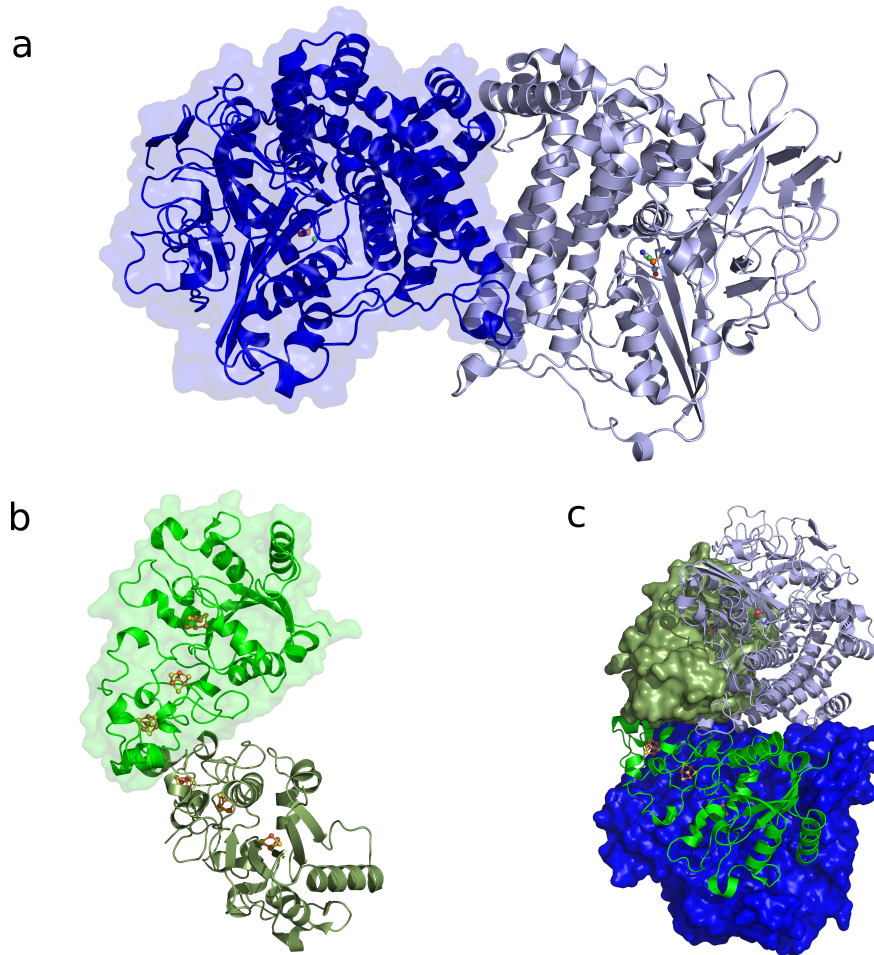
Abbildung 2.15: Aktives Zentrum einer [FeFe]-Hydrogenase

Hier dargestellt ist das aktive Zentrum einer FeFe-Hydrogenase. Auf der rechten Bildseite befindet sich die molekulare Darstellung, rot sind die bindenden Aminosäuren dargestellt. Im Zentrum befindet sich das FeFe-Cluster gebunden an den Cyanid-Methylether-Komplex. Erkennbar sind ebenso die polaren Wechselwirkungen mit den entsprechenden Resten des Proteinbackbones (dunkelblau). Links befindet sich die schematische Darstellung des Moleküls.

Hydrogenase zur Wasserstoffproduktion eignet. Hydrogenasen setzen sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammen. Die große Untereinheit besteht aus zwei identischen Ketten mit einer Länge von 582 Aminosäuren. Beide enthalten das aktive Zentrum bestehend aus einem Kohlenstoffmonoxiddicyano-Eisen-Komplex mit assoziiertem Nickel(II)-ion. Die kleine Untereinheit besteht ebenso aus zwei identischen Teilpeptiden mit einer Länge von 335 Aminosäuren. Zudem sind drei unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster im Komplex gebunden (siehe Abbildung 2.16). Die Verankerung des Enzyms erfolgt über C-Terminale Helices an den kleinen Untereinheiten. Hierüber erfolgt die Assoziation zu Cytochrom-b-Komplexen. [VAD⁺12].

Nitrogenasen

Nitrogenasen sind Enzyme zur Stickstofffixierung. Sie tragen, je nach Elektronendonator die EC-Nummer 1.18.6.1 beziehungsweise 1.19.6.1. Sie zählen also ebenso wie die Hydrogenasen zu den Oxidoreduktasen mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als Elektronendonator im Falle der EC 1.18.x.x, mit Flavodoxin als Elektronendonator im Falle der EC 1.19.x.x. Als Elektronenakzeptor agiert laut EC 1.18/19.6.x Stickstoff [TBb]. Dies bedeutet, dass aus molekularem Stickstoff Ammoniak oder Nitrat synthetisiert wird. Unter bestimmten Gegebenheiten kann aber auch Wasserstoff mittels einer Nitrogenase ge-



PDB:ID 3UQY Hellwig 2014

Abbildung 2.16: [NiFe]-Hydrogenase

Diese Abbildung zeigt den Aufbau einer [NiFe]-Hydrogenase, extrahiert aus *E.coli*. In Bildteil **a** ist die große Untereinheit dargestellt. Die beiden identischen Teilpeptide sind zur besseren Unterscheidung in dunkel- und hellblau eingefärbt. Das aktive Zentrum ist zentral in der Mitte der Proteinkomplexe gelegen. Grün ist hierbei das Nickel(II)-ion, orange das Eisen gebunden an den Kohlenstoffmonoxid Cyanokomplex. Über die linke Peptidkette wurde transparent die Oberflächengestalt des Proteins gelegt. Bildteil **b** stellt die kleine Untereinheit der Hydrogenase dar. Auch hier wurden zur besseren Unterscheidung beide identischen Untereinheiten unterschiedlich eingefärbt. Zu erkennen sind die drei Eisen-Schwefel-Cluster pro Teilpeptid. In Bildteil **c** ist die Hydrogenase in ihrer kompletten Gestalt dargestellt. Beide großen Untereinheiten sind mit den kleinen assoziiert. Es ist deutlich erkennbar wie dicht die Struktur gepackt ist.

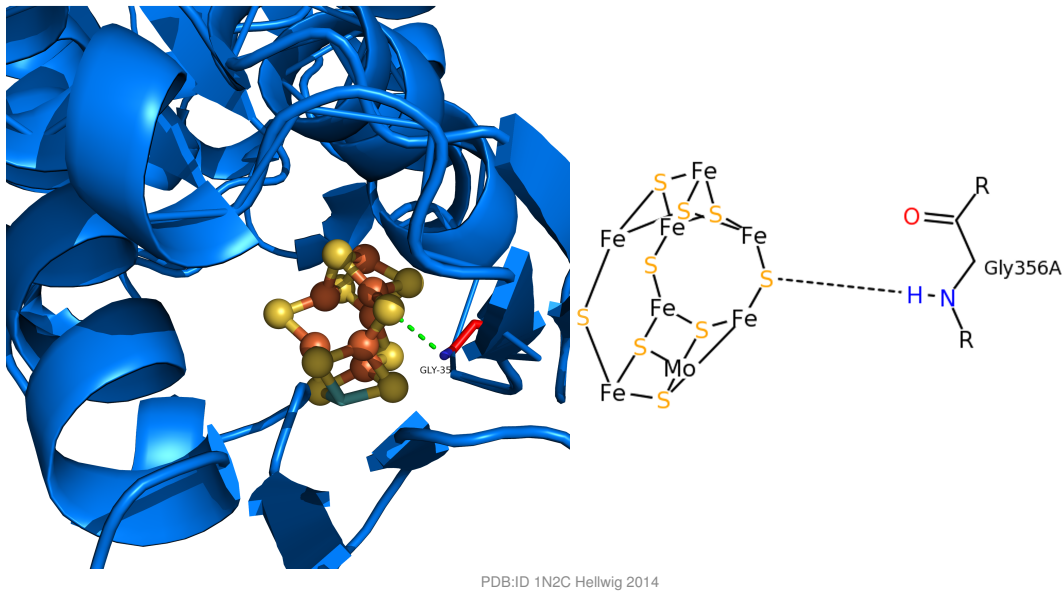
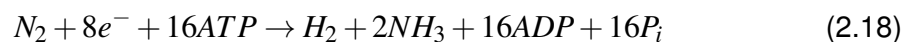


Abbildung 2.17: [FeMo]-Nitrogenase

In dieser Abbildung wird die Bindung des aktiven Zentrums der Nitrogenase in der Proteinkette dargestellt. Auf der linken Bildhälfte ist die rechte schematische Abbildung im 3D-Modell zu sehen. Zu erkennen ist das Backbone der ersten α -Kette der Dinitrogenase, darin befindet sich im Stabmodell der Rest 356 (Glycin). Die Bindung erfolgt über das Stickstoffatom der Peptidbindung mit einem Schwefelatom des Eisen-Molybdän-Schwefelclusters (Schwefel: gelbe Sphären, Eisen: orange Sphären, Molybdän: türkise Spitze).

bildet werden. Der Vorteil an Nitrogenasen zur Wasserstoffproduktion liegt darin, dass sie im Gegensatz zu Hydrogenasen die Reaktion lediglich in Richtung des Wasserstoffs katalysieren. Die Energie für die Katalyse stammt aus der Spaltung von ATP in ADP. Die Reaktion zur Stickstofffixierung ist dabei wie folgt [SMK113]:

Stickstofffixierung durch eine Nitrogenase



Ebenso wie bei Hydrogenasen ist das Reaktionszentrum der Nitrogenasen sehr anfällig auf Sauerstoff und wird bei Kontakt zerstört. Eine Hydrogenese kann demnach nur unter Sauerstoffabschluss und Stickstofflimitation nach Gleichung stattfinden.

Hydrogenese durch eine Nitrogenase



Nitrogenasen bestehen aus zwei Proteinkomplexen: zum einem aus einem Eisen-Protein, zum anderem aus einem Molybdän-Eisen-Protein. Das aus zwei identischen Teilen bestehende [Fe]-Protein wird auch als Dinitrogenase-Reduktase bezeichnet und enthält ein einzelnes Eisen-Schwefel-Cluster. Dieses Cluster dient als Elektronenakzeptor für Ferredoxin beziehungsweise Flavodoxin und gibt die Elektronen weiter an den [MoFe]-Komplex der Dinitrogenase. Zur Weitergabe der Elektronen werden jeweils zwei ATP pro Elektron benötigt. Daraus ergibt sich der Verbrauch von vier ATP pro generiertem Wasserstoffmolekül (siehe Reaktionsgleichung 2.19). Ein kompletter Nitrogenasekomplex besteht wiederum aus jeweils zwei identischen Dinitrogenase-Reduktase-Komplexen und zwei Dinitrogenase-Komplexen (siehe Abbildung 2.18) [SKS⁺97]. Die α -Ketten der Dinitrogenase haben eine Länge von 491, die beiden β -Ketten eine Länge von 522 Aminosäuren. Die Bindung des [FeMo]-Komplexes findet über polare Wechselwirkungen eines Schwefelatoms mit der Aminogruppe des 356. Glycinrestes der Kette A des α -Komplexes statt (siehe Abbildung 2.17).

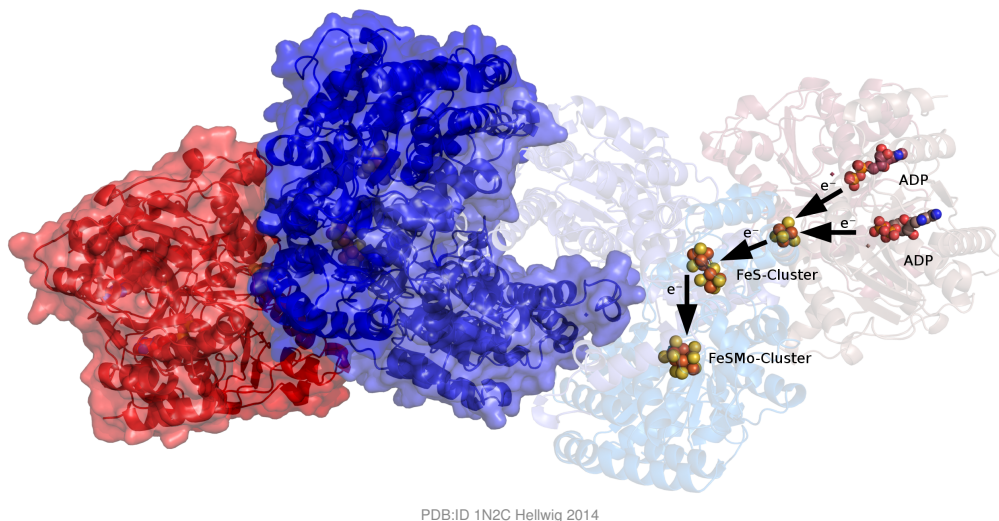


Abbildung 2.18: [FeMo]-Nitrogenase-Weg der Elektronen

In dieser Abbildung ist ein kompletter Nitrogenasekomplex zu sehen. Dieser besteht aus zwei großen (Dinitrogenase) und zwei kleinen Untereinheiten (Dinitrogenase-Reduktase), welche wiederum selbst aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut sind. Der linke Teil der Nitrogenase zeigt eine kleine (rot) und eine große (dunkelblau) Untereinheit mit ihrer Moleküloberfläche. Darunter ist die ausgeprägte Sekundärstruktur zu sehen, sowie teilweise die aktiven Zentren. Der linke Teil des Proteins besteht ebenso aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. An dieser Stelle wurde auf die Darstellung der Moleküloberflächen, zur besseren Erkennbarkeit der aktiven Zentren, verzichtet. Transparent dargestellt ist hier ebenso die ausgeprägte Sekundärstruktur. Ganz links sind zwei assoziierte ADP-Moleküle zu erkennen. Der Elektronenübergang läuft vom ADP über zwei Eisen-Schwefel-Cluster zum aktiven Eisen-Schwefel-Molybdän Zentrum. Eisen und Schwefel sind als orange beziehungsweise gelbe Sphären erkennbar.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

- Applikon 1 I-Bioreaktor
- Applikon ADI 1030 Bio Controller
- Applikon ADI 1032 Stirrer Controller P100
- Cole-Parmer MasterFlex 7523-20 Pumpenantrieb
 - Cole-Parmer MasterFlex easy-load II 77200-50 Pumpenkopf
- Cole-Parmer Masterflex 7550-50 Pumpenantrieb
 - Cole-Parmer MasterFlex easy-load II 77202-50 Pumpenkopf
- Ritter MilliGascounter MGC-1 V3.2 PMMA
- Greisinger Digital-Feinmanometer GMH3181-07
- Beckmann DU 520 UV/Vis Spectrophotometer

3.1.2 Chemiekalien/Lösungen und Organismus

Organismus Für die Versuche wurde der Wildtyp des Organismus *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 verwendet. Der Stamm wurde von der DSMZ⁴ bezogen.

Medien Als Besonderheit bei der Medienherstellung ist anzumerken, dass die Vitaminlösung erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt werden konnte, da die darin enthaltenen Nährstoffe nicht hitzebeständig sind. Hierfür wurde unter einer Laminarbox

⁴ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

unter Zuhilfenahme einer sterilen Spritze und eines 0,45 µm Sterilfilters die Vitaminlösung den Nährmedien zugesetzt. Zusätzlich wurde der pH-Wert vor dem Autoklavieren auf 9,4 eingestellt um nach dem Vorgang einen pH-Wert von circa 7,0 zu erhalten. Das Autoklavieren erfolgte bei 121 °C für 20 Minuten.

Tabelle 3.1: Konzentrationen Kohlenstoffquellen

Diese Tabelle enthält die Zusammensetzung von Vorkulturmedium (VK-Medium) und Hauptkulturmedium (HK-Medium). Der Hauptunterschied liegt in der Glutamat- und Kohlenstoffquellenkonzentration. Hierbei ist anzumerken, dass für die Medien jeweils nur eines der Substrate als Kohlenstoffquelle diene.

Chemikalie	VK-Medium [g*L ⁻¹]	HK-Medium [g*L ⁻¹]
Kohlenstoffquelle		
Lactat 98% (v/v) (Fluka)	0,3	3,6
Glycolsäure (Merck KGaA)	0,38	4,56
D-Malat (KGaA)		5,36
Stickstoffquelle		
Glutamat (Merk KGaA)	3,0	1,5
Salze		
Di-Kaliumhydrogenphosphat (Roth) (K_2HPO_4)	0,9	
Kaliumdihydrogenphosphat (Roth) (KH_2PO_4)	0,6	
Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2	
Calciumchlorid ($CaCl_2$) (Merck KGaA)	0,1	
Lösungen in [mL]		
Vitaminlösung 10x (siehe Tabelle 3.3)	5	
Spurenelementelösung (siehe Tabelle 3.2)	50	
EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.4)	50	

3.2 Methoden

3.2.1 Erstellen der Vorkultur

Als Grundlage für das Inokulum des Reaktors diene eine gesondert kultivierte Vorkultur. Hierfür wurde in eine 100 ml Schott-Flasche zunächst circa 80 ml Vorkulturmedium ste-

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Spurenelementelösung

Chemikalie	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
Mangan(II)-chloridtetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA)	45
Kobalt(II)-chloridhexahydrat (CoCl_2) (Roth)	19
Kupfer(II)-sulfat (CuSO_4) (Merck KGaA)	5
Natriummolybdatdihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA)	50
Zinkchlorid (ZnCl_2) (Riedel - de Haën)	10
Lithiumchlorid (LiCl) (Merck KGaA)	2
Zinn(II)-chloriddihydrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA)	2
Borsäure (H_3BO_3) (Roth)	5
Kaliumbromid (KBr) (Merck KGaA)	1
Kaliumiodid (KI) (Merck KGaA)	1
Bariumchloriddihydrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA)	1

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Vitaminlösung

Chemikalie	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
4-Aminobenzoessäure (Fluka)	40
Nicotinsäure (Sigma-Aldrich)	200
Thiaminhydrochlorid (Sigma-Aldrich)	200
Biotin (Roth)	20

Tabelle 3.4: Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA-Lösung)

Chemikalie	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
EDTA-Eisen(III)-Natriumsalz (Fluka)	2,3

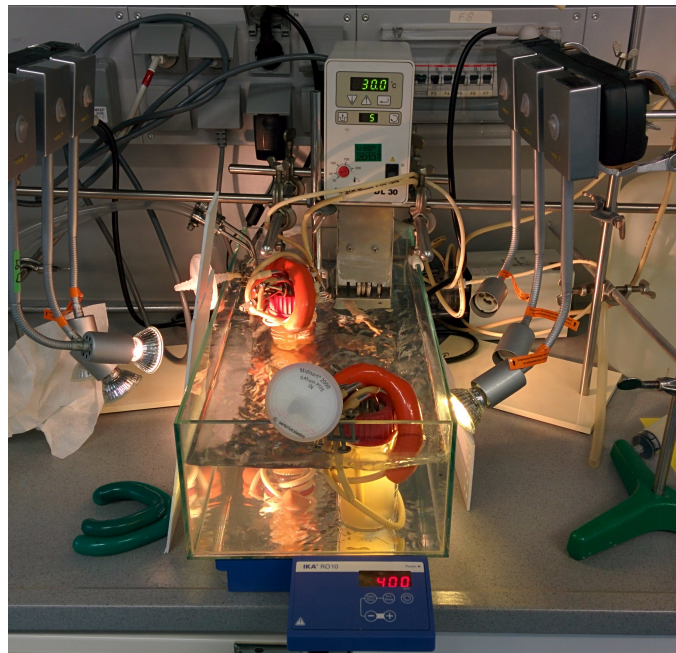
ril eingefüllt und mit 2 ml einer aeroben Übernachtskultur von *Rhodobacter sphaeroides* angeimpft. Zum Überführen der aeroben Kultur in anoxische Kultivierungsverhältnisse sowie zur Entfernung von Stickstoff aus dem Medium wurde die Vorkultur für 10 Minuten unter Rühren mit Helium gespült. Die eigentliche Kultivierung der Vorkultur fand in einem auf 30 °C temperiertem Wasserbad statt (siehe Abbildung 3.1). Die Kulturen wurden dabei ständig mit 400 rpm mit einem Magnetrührfisch gerührt. Um Bewuchs im Kulturbad zu vermeiden, wurde zur Befüllung auf deionisiertes Wasser zurückgegriffen. Dies zeigte aber nicht den gewünschten Erfolg, sodass das Wasserbad in regelmäßigen Abständen gereinigt werden musste um eine gleichbleibend gute Durchleuchtung zu gewährleisten. Außerdem wurde die Kultur mit einer 28 W (Watt) Halogenlampe permanent beleuchtet. Die Vorkultur wurde alle zwei Tage subkultiviert. Dies erfolgte durch Zugabe von 2ml Vorkultur zu circa 100 ml Vorkulturmedium in eine 100 ml Schottflasche. Anschließend wurde die neue Vorkultur mit Helium gespült und in das Vorkulturbad gestellt. Die alte Kultur wurde verworfen. Am Wochenende wurde die Vorkultur automatisch mit 100 ml Vorkulturmedium verdünnt. Dies wurde über ein Pumpensystem mit Zu- und Ablauf für frisches und verbrauchtes Medium erreicht. Der Schaltzeitpunkt der Pumpe wurde mit einer Zeitschaltuhr gesteuert. Für die Kultivierungsversuche wurden unterschiedliche Vorkulturen verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der Beleuchtung im Vorkulturbad wurde eine Kultur mit einer 5 W warmweißen GU10 LED-Leuchte bestrahlt. Des Weiteren wurden Vorkulturen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen für die Fermentation im Reaktorsystem kultiviert.

3.2.2 Aufbau des Batchsystems

Die Versuche zum Einfluss der Beleuchtung sowie die Tests unterschiedlicher Substrate zur Wasserstoffproduktion fanden in einem 1l-Applikon-Rührkesselreaktor statt. Dieser war von einem Beleuchtungsring mit 12 Lampenfassungen umgeben, sodass unterschiedliche Leuchtmittel getestet werden konnten. Die Lampen waren dabei in drei Bündeln mit je vier Lampen im Ring arrangiert (siehe Abbildung 3.2). Der eigentliche Versuchsaufbau lässt sich allgemein in drei Teile gliedern:

- Reaktor
- Abgassystem
- Regelungssystem

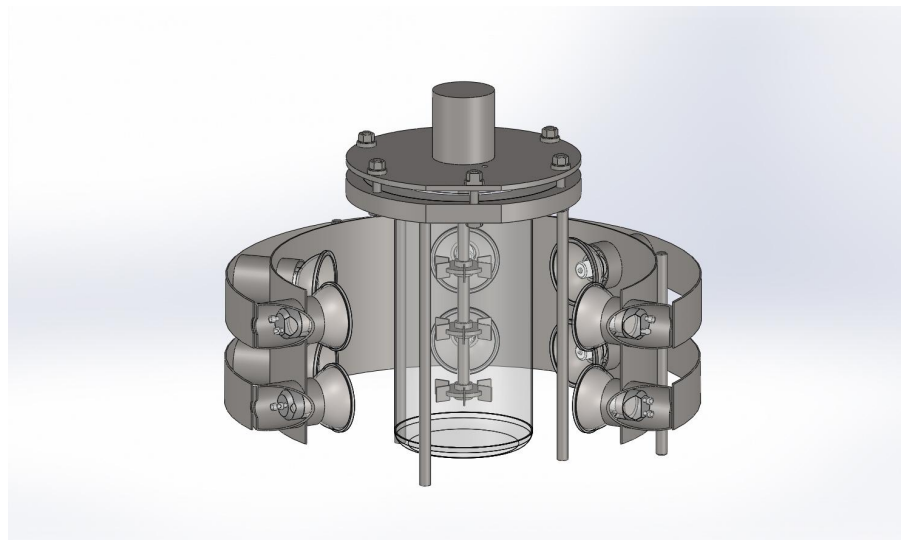
Reaktorsystem Der Reaktor (1) selbst bestand aus einer Rührerwelle mit drei Scheibenrührern, umgeben war diese von einer Kühlschleife. Unterhalb der Kühlschleife und



Helliwig 2014

Abbildung 3.1: Vorkulturbad

Die Abbildung zeigt das Vorkultur- und Screeningbad. Zu sehen sind zwei von Halogenlampen beleuchtete Vorkulturflaschen, sowie das auf 30 °C eingestellte Thermostat und die auf 400 rpm eingestellte Magnetrührplatte.



Felix Krujatz, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (TU Dresden)

Abbildung 3.2: Applikon 1l Reaktor im Beleuchtungsring

In dieser Abbildung ist der Beleuchtungsring, sowie der darin eingeschlossene Rührkesselreaktor dargestellt.

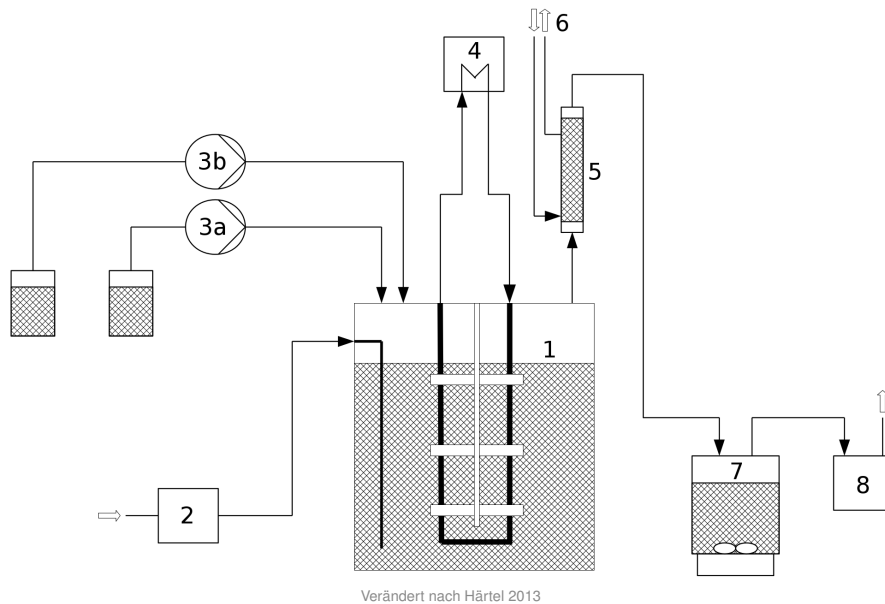


Abbildung 3.3: Versuchsaufbau - Batchsystem - Schema

An dieser Stelle wird der schematische Aufbau des Batch-Reaktorsystems dargestellt. Es sind der Reaktor mit drei Scheibenrührern (1), das Begasungssystem (2), das pH-Korrekturmittelsystem (3), das Kühlsystem (4) für den Reaktor, der Abgaskühler (5) mit Kühlmittelanschlüssen (6), die CO₂-Ausfällung und der Gaszähler (8) abgebildet.

mittig unter dem Rührer befand sich ein Begasungsrohr zum diffusen Eintrag unterschiedlicher Gase ins Reaktorsystem.

Korrekturmittel und Begasungssystem Die Begasung beziehungsweise der Gaseintrag wurde über einen externen Massflowcontroller eingestellt (2). Als Gase kamen sowohl Druckluft als auch Helium zum Einsatz. Zwischen Reaktor und Massflowcontroller wurde zur Erhaltung der Sterilität des Reaktormediums ein Sterilfilter zwischengeschaltet. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,0 eingestellt. Hierfür diente als Korrekturmittel eine 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) beziehungsweise eine 2 M Kaliumhydroxidlösung (KOH). Beide wurden mit Hilfe von Peristaltikschlauchpumpen in das Reaktorsystem zudosiert (3a,3b). Sowohl der pH-Wert, die Temperatur, als auch die Sauerstoffsättigung im Medium wurden durch eine entsprechende Prozesselektronik kontrolliert.

Kühlsystem - aktive Temperaturregulierung Zur Temperaturregulierung des Reaktors musste dieser aktiv gekühlt werden, da durch die Beleuchtung ein starker Wärmeinput in das System stattfand. Hierfür wurde ein externes Kühlgerät (4) an die Kühlwendel des Reaktors angeschlossen. Die Kühlung wurde auf 5°C eingestellt bei Fer-

mentationen mit Halogenbeleuchtung, auf 27°C bei Kultivierungen mit LED-Beleuchtung. Die Temperatur wurde hierbei aktiv durch den Biocontroller reguliert. Hierzu wurde ein 3-Wege-Ventil zwischen Kühlsystem (4) und Reaktor (1) eingebaut. Dieses Ventil wurde an einen digitalen Ausgang des Biocontrollers gekoppelt und blieb stromlos geöffnet. Somit wurde der Durchfluss von Kühlmittel durch den Reaktorkühlkreislauf gewährleistet. Sank die Temperatur zu weit, so wurde das Ventil vom Biocontroller angesteuert und durch angelegte Spannung geschlossen. Der Kühlkreislauf konnte somit unterbrochen werden und der Reaktor heizte auf.

Abgassystem Das produzierte Gas wurde zunächst durch einen Abgaskühler (5) geleitet. Dieser sorgte dafür, dass Flüssigkeit die aus dem Kulturmedium durch Wärmezufuhr ausgetragen wurde, zurück ins Medium überführt werden konnte. Der Abgaskühler wurde an das laborinterne Kühlsystem angeschlossen. Die Temperatur des Kühlwassers betrug im Allgemeinen circa 8°C. Im weiteren Verlauf gelangte das Gas in die CO₂-Ausfällung. Dies war nötig um das bei der Fermentation entstehende CO₂ zu entfernen, damit die anschließende Volumenerfassung nur den entstandenen Wasserstoff erfasste. Hierbei reagierte zunächst das Kohlenstoffdioxid mit Wasser zu Kohlensäure (Gleichung 3.1). Die Carbonationen der Kohlensäure wiederum reagierten ihrerseits mit den Bariumionen des Bariumhydroxids zu festem Bariumcarbonat, welches letztlich ausfiel (Gleichung 3.5).

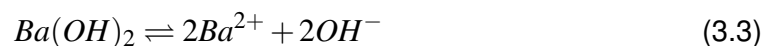
Lösen von Kohlestoffdioxid (CO₂) in Wasser (H₂O) unter Bildung von Kohlensäure (H₂CO₃)



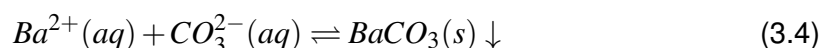
Dissoziation der Kohlensäure (H₂CO₃)

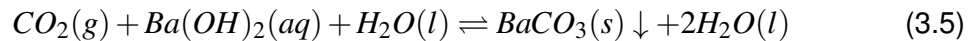


Dissoziation des Bariumhydroxids (Ba(OH)₂)



Ausfällen des Bariumcarbonats (BaCO₃)



Gesamtgleichung

3.2.3 Aufbau des Chemostatsystems

Der Aufbau des kontinuierlichen System gestaltete sich ähnlich dem des Batchsystems, wobei die Komplexität anforderungsbedingt ungleich höher war. Um das System chemisch konstant zu betreiben, musste neben der Möglichkeit zur pH-Wertregulierung auch ein System zum Zu- und Abführen von Medium zum Reaktor hin beziehungsweise vom Reaktor weg installiert werden. Hierbei ergab sich die Schwierigkeit der Regulation des Zu- und Abführsystems. Ebenso musste eine Möglichkeit geschaffen werden, die Abfuhrstrecke schnell und wenig invasiv zu reinigen, da sich im Laufe der Fermentation zunehmend Biomasse in den Bereichen mit geringen Durchflussgeschwindigkeiten absetzte. Des Weiteren war es nötig, die CO_2 Falle effektiver beziehungsweise größer auszulegen als in den Batchversuchen. Das Chemostat-System ließ sich grob in die folgenden Segmente untergliedern:

- Korrekturmittelsystem (3a,3b)
- Begasung (2)
- Feed- und Wastesystem (9-17)
- Abgasstrecke (5-8)
- Kühlung (4)
- Reaktor (1)

Reaktor Der Reaktor gleicht weitestgehend dem Reaktor im Batchbetrieb.

Begasung Die Begasung erfolgte ebenso analog zum Batchsystem.

Kühlsystem Die Kühlung verlief ähnlich zum Batchreaktor, mit dem Unterschied, dass ein Kühlaggregat mit höherer Leistung verwendet wurde. Im Batchsystem wurde ein Haake-Kühler mit 300 W Leistung, im Chemostatsystem ein Thermo Fischer Kühler mit 500 W Leistung verwendet.

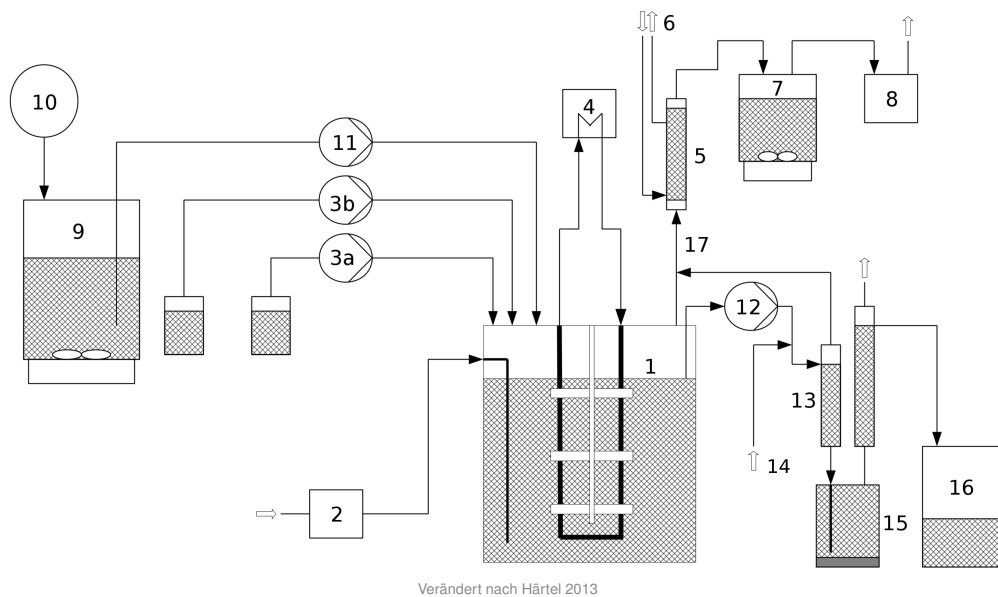
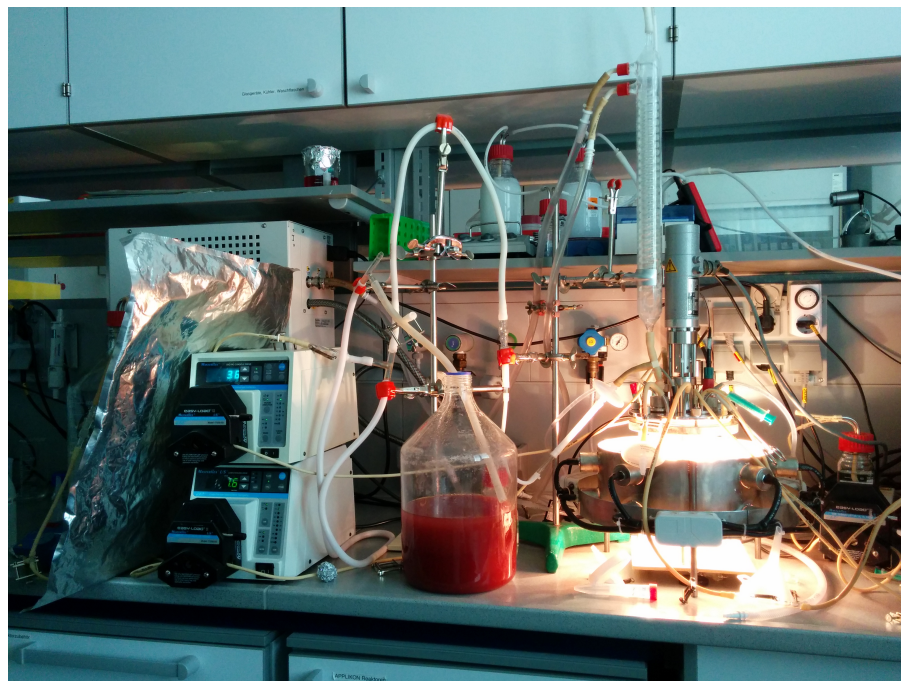


Abbildung 3.4: Versuchsaufbau - Chemostatsystem - Schema

An dieser Stelle wird der schematische Aufbau des Chemostat-Reaktorsystems dargestellt. Es sind der Reaktor mit drei Scheibenrührern (1), das Begasungssystem (2), das Korrekturmittelsystem (3), das Kühlsystem (4) für den Reaktor, der Abgaskühler (5) mit Kühlmittelanschlüssen (6), die CO_2 -Ausfällung (7) und der Gaszähler (8) abgebildet.



Hellwig 2014

Abbildung 3.5: Versuchsaufbau - Chemostatsystem - Schema

Diese Abbildung zeigt das Chemostatsystem. Erkennbar sind sowohl der Reaktor als auch die Feed- und Wastepumpe. Im Hintergrund ist zusätzlich die Abgastrecke sichtbar.

Korrekturmittelsystem Als Korrekturmittel wurden ebenfalls eine 1 M Schwefelsäure und eine 2 M Kaliumhydroxid-Lösung verwendet. Der pH-Wert wurde auf $7,3 \pm 0,03$ eingestellt.

Abgasstrecke Die Abgasstrecke war ebenfalls ähnlich zu der des Batchsystems. Zur Erfassung des Systemdrucks, wurde allerdings zwischen Abgaskühler (5) und CO₂-Ausfällung ein Manometer zwischen geschaltet. Da das System auch gelegentlich zum Unterdruck neigte, wurde zum Schutz des Reaktors und des Manometers zwischen Abgaskühler und CO₂-Ausfällung zusätzlich eine 100 ml Schottflasche eingebaut. Diese konnte Bariumhydroxid, das durch Unterdruck eventuell angesaugt wurde, auffangen und ein Eindringen in das Reaktorsystem verhindern.

Feedsystem Zur kontinuierlichen Zufuhr von Medium in das System wurde ein Vorlagebehälter (9) über eine regelbare Peristaltikpumpe (11) an den Reaktor angeschlossen. Um den Volumenverlust durch das Abpumpen von Medium aus dem Behälter zu kompensieren, wurde ein mit Helium gefüllter Gasbeutel (10) am Vorlagebehälter angebracht. Dies sollte verhindern, dass sauerstoff- und stickstoffhaltige Luft über das Nährmedium in den Reaktor eingebracht wird.

Wastesystem Um verbrauchtes Medium aus dem System zu entfernen wurde ein System zum Abpumpen installiert. Hierfür wurde eine regulierbare Pumpe verwendet (12), deren Volumendurchsatz einen deutlich höheren Wert aufwies als die der Feedpumpe. Damit sollte ein Überlaufen des Systems verhindert werden. Durch den höheren Durchsatz wurde aber zeitgleich nicht nur Medium, sondern auch Gas aus dem Reaktorkopfraum abgezogen. Dieses musste in das System zurückgeführt werden. Hierfür wurde ein Gas-Flüssig-Separator eingebaut (13). Dieser bestand aus einem Schlauch, an den ein T-Stück angefügt wurde. Das Medium wurde in das T-Stück gepumpt. Die schwere flüssige Phase sank darin nach unten ab, die Gasphase konnte nach oben entweichen und wurde über einen Schlauch in das Reaktorsystem zurückgeführt (17). Die flüssige Phase enthielt je nach Betriebsart viel Biomasse. Diese setzte anfangs zunehmend den Gas-Flüssig-Abscheider zu und führte zum Verstopfen des Systems. Das Verstopfen des Abscheiders hatte zur Folge, dass die Flüssigkeit nicht mehr abfließen konnte. Somit stieg die Flüssigkeit bis das T-Stück der Gasrückführung am Reaktor erreicht wurde (17) und verstopfte den zwischengeschalteten Sterilfilter. Dadurch konnte kein Druckausgleich mehr stattfinden. Dies führte letztlich zu starkem Unterdruck im System und machte eine fortwährende Fermentation unmöglich. Um das Verstopfen des

Filters bei (17) zu vermeiden, wurde zunächst eine 100 ml Schottflache dazwischen geschaltet. Des Weiteren wurde am Gas-Flüssig-Abscheider ein Fest-Flüssig-Abscheider (15) installiert. In diesem Gefäß konnte sich tote Biomasse am Boden absetzen und nicht mehr das System verstopfen. Letztlich gelangte das verbrauchte Medium in einem Auffangbehälter (16). Im Schema ist ein Höhenunterschied zwischen dem Wastemediumeingang in den Separator und dem Ausgang des Mediums zu erkennen. Dieser Höhenunterschied korrespondierte mit dem Überdruck im Reaktorsystem von circa 16 mbar.

3.2.4 Inbetriebnahme der Systeme

Vorbereitung Vor Beginn jedes Versuchs musste zunächst die Fermentationstechnik auf den Einsatz vorbereitet werden. Hierzu waren im Allgemeinen die folgenden Arbeitsschritte nötig:

- Kalibrierung der pH-Sonde
- Einsetzen der Sonden (pH, pO_2) in den Reaktor
- Verschließen sämtlicher Eingänge in den Reaktor mit Quetschhähnen
- Abdecken der Sterilkupplungen und Sterilfilter mit Alufolie
- Autoklavieren des Reaktors

Die Kalibrierung der pH-Sonde basierte auf einer Zweipunktkalibrierung mit zwei unterschiedlichen pH-Wertpuffern im Messbereich der Fermentationsbedingungen. Hierzu wurde ein pH-7 und ein pH-10 Puffer verwendet. Zunächst wurde die pH-Elektrode hierzu mit dem Biocontroller verbunden. Danach wurde im Menü [Manual] des Biocontrollers die Kalibrierfunktion für die pH-Messtechnik ausgewählt und nach entsprechender Eingabe der Puffertemperatur zur Auswahl des ersten Puffers gewechselt. Hierbei kam zunächst der pH-7 Puffer zum Einsatz. Die pH-Elektrode wurde nun in die Pufferlösung gestellt und so lang darin belassen bis sich ein konstantes Potential eingestellt hatte. Dies war erkennbar an einer konstanten pH-Wertanzeige im Monitorfenster des Biocontrollers. Mit konstantem Potential wurde der eigentliche Kalibriervorgang durch den Biocontroller, nach manueller Bestätigung am Gerät, gestartet. Das Gerät begann daraufhin mit der Messung des momentanen Elektrodenpotentials. Blieb dieses für eine Weile in gewissen Grenzen konstant, so wurde der Wert übernommen und der Biocontroller wechselte automatisch zur Eingabe des zweiten Puffers. Es erfolgte nun die Kalibrierung des zweiten Messpunktes analog zum vorangegangenen Puffer. Nach der Kalibrierung wurde die Elektrode vom Biocontroller getrennt und in den Reaktor eingebaut. Als nächstes erfolgte das Verschließen sämtlicher Ausgänge des Reaktors durch

das Abklemmen der entsprechenden Schläuche mit Quetschhähnen. Glassterilkupplungen wurden zusätzlich mit Silikonfett eingefettet. Zusätzlich wurden alle Sterilfilter und Sterilkupplungen mit Alufolie eingewickelt. Der so präparierte Reaktor wurde zusammen mit dem installierten Abgaskühler in einen Autoklav gestellt. Hierzu kamen noch zusätzlich eine 1000 ml sowie eine 250 ml Schottflasche, jeweils versehen mit einem Zwei-Port-Deckel mit einer Sterilkupplung an dem einem und einem Sterilfilter am anderem Port. Außerdem wurde ein mit Alufolie abgedeckter 250 ml Messzylinder sowie eine 100 ml Schottflasche mit in den Autoklaven gegeben. Die Sterilisation erfolgte automatisch unter Heißdampf bei 121 °C für 20 Minuten. Nach der Sterilisierungsphase wurde der Reaktor aus dem Autoklav entnommen und zum Temperieren an das Kühlsystem angeschlossen. Außerdem wurden die Messeinrichtungen am Reaktor mit dem Biocontroller verbunden. Zur besseren Temperierung wurde zusätzlich der Rührermotor auf der Welle montiert und in Betrieb genommen. Nachdem der Abgaskühler abgekühlt war, wurde auch dieser an das Laborkühlsystem angeschlossen. Außerdem wurde der Reaktor mit 750 ml Medium befüllt. Hierzu wurde steril unter einer Laminarbox Medium mit Hilfe des zuvor autoklavierten 250 ml Messzylinders in die ebenfalls sterile 1 l Schottflasche überführt. Diese wurde dann über die Glassterilkupplung mit dem Reaktor verbunden. Zur Sicherstellung der Sterilität dieser Verbindung fand das Ankoppeln unter einer entleuchteten Brennerflamme statt. Nun wurde Druckluft über den Massflowcontroller mit einem Volumenstrom von circa 800 ml·min⁻¹ über den Sterilfilter der Schottflasche angelegt. Daraus resultierte das Überführen des Mediums in den Reaktor. Nach erfolgreicher Überführung wurde die Schottflasche von der Druckluft getrennt und die Verbindungen zum Reaktor wurden abgeklemmt. Die Druckluft wurde nun an den Begasungsanschluss des Reaktors gekoppelt. Gleichzeitig erfolgte die Inbetriebnahme des Beleuchtungsrings sowie die Aktivierung der Temperaturregelung am Biocontroller im Menü [Process]. Des Weiteren wurden die Korrekturmittelflaschen mit den Pumpen und dem Reaktor verbunden. Über das Menü [Utility] am Biocontroller erfolgte das manuelle Ansteuern der Korrekturmittelpumpen zum Vorpumpen der Säure beziehungsweise Lauge. Nachdem sich die Temperatur bei 30 °C eingeppegelt hatte und der pH-Wert (sofern die Länge der Elektrode eine Messung ermöglichte) auf pH 7,0 eingestellt war, erfolgte die Kalibrierung der pO₂-Elektrode ebenfalls als Zweipunktkalibrierung. Zunächst wurde der höchst mögliche Sauerstoffsättigungswert kalibriert. Dieser wurde erreicht durch die Begasung des Mediums mit Druckluft. Die Kalibrierung erfolgte im Menü [Manual]. Nach dem Inokulieren des Reaktors wurde direkt der zweite Messpunkt kalibriert. Letztlich wurde der Reaktor vom Massflowcontroller getrennt und an die Abgasstrecke angeschlossen. Im Falle eines Batchversuches wurde ebenso die pH-Regulierung deaktiviert.

Inokulation Zum Beimpfen mussten zunächst einige Vorbereitungen getroffen werden. Die Fermentationen starteten alle mit einer optischen Dichte (OD) von 0,1. Hierzu musste also zunächst das Volumen an Vorkultur bestimmt werden, das nötig war um nach der Inokulation die genannte OD im Reaktorsystem zu generieren. Hierfür wurden der Vorkultur steril unter einer Laminarbox drei Proben entnommen um deren OD zu bestimmen. Diese Dreipunktbestimmung war nötig, da die Durchmischung der Vorkulturen recht schwierig war und somit mit einer Einfachbestimmung kein repräsentatives Ergebnis zu erwarten war. Es wurde mit 250 ml angeimpft, da sich im Reaktor bereits 750 ml HK-Medium befanden. Um eine OD von 0,1 im Reaktor zu erreichen, musste im Inokulum eine OD von 0,4 in 250 ml vorliegen. Die Formel zur Bestimmung der Menge an Vorkultur findet sich unter Gleichung 3.6. Das berechnete Volumen an Vorkultur wurde nun in den 250 ml Messzylinder pipettiert und auf 250 ml mit Medium aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde nun in die sterile 250ml Schottflasche gefüllt. Diese wurde wie bereits beschrieben an den Reaktor über eine Sterilkupplung angebunden. Die Überführung des Inokulums in den Reaktor erfolgte nicht mit Druckluft (wie bereits vorher das Umspülen des Mediums), sondern mit Helium. Hierfür wurde der Massflowcontroller mit dem laborseitigem Heliumanschluss gekoppelt und auf $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt. Nach erfolgreicher Übertragung erfolgte die Trennung des Heliums von der Inokulumflasche und das Abklemmen dieser vom Reaktor. Das Helium wurde nun an die Begasungseinrichtung des Reaktors angeschlossen. Durch das Spülen des Reaktors mit Helium wurde für den Prozess schädlicher Stickstoff sowie Sauerstoff ausgetrieben.

Berechnung des Volumens an Vorkultur zum Inokulieren des Reaktors

$$V_{VK} = \frac{OD_{Ziel} \cdot V_{Inokulum}}{OD_{VK}} \quad (3.6)$$

Ende der Versuche - Abbau Nach circa 40 Stunden im Batchbetrieb beziehungsweise nachdem kein Wasserstoff mehr gebildet wurde oder der Zustand des Chemostatsystems keinen weiteren reibungslosen Betrieb mehr gewährleisten konnte, wurde der Versuch beendet. Hierfür wurde zunächst die Beleuchtung abgeschaltet, damit das System abkühlen konnte. Außerdem wurde die aktive Temperaturregulierung am Biocontroller deaktiviert, was ein schnelleres Abkühlen des Systems ermöglichte. Des Weiteren erfolgte die Deaktivierung der pH-Regulierung (am Chemostat). Die Reaktorverbindung zu den Korrekturmittelflaschen wurde unterbrochen und das in den Schläuchen verbliebene Korrekturmittel wurde manuell in den Reaktor gepumpt. Danach erfolgte die Deaktivierung aller Kühlaggregate und das Autoklavieren des Reaktors bei $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten zum Abtöten der Organismen. Im Anschluss wurde der Reaktor entleert und

unter DI-Wasser gereinigt.

Probenahme Die Beprobung der Reaktoren erfolgte im Zwei-Stunden-Takt. Es wurden täglich fünf Proben entnommen. Die erste Probenahme erfolgte 17 Stunden nach Inokulation. Zur Beprobung wurde zunächst 1 ml Kultur über den Probenahmeport des Reaktors mit Hilfe einer 5 ml Spritze entnommen und verworfen. Danach erfolgte eine weitere Kulturentnahme. Das Volumen richtete sich je nach Probezeitpunkt und Dichte der Kultur. Bei geringer Bakterienkonzentration wurden maximal 4 ml entnommen. Hiervon wurden 2 ml in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für 3 Minuten bei 4 °C und 11000 rcf zentrifugiert. Der Rest wurde zur Bestimmung der optischen Dichte des Mediums genutzt. Nach der Zentrifugation der Probe bildete sich ein festes rot bis oranges Pellet am Boden des Mikroreaktionsgefäßes. Der Überstand der Probe wurde in ein weiteres 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut bei 4 °C für 5 Minuten unter 11000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Aus diesem wurden schließlich 1000 µl in ein Mikroreaktionsgefäß zur Lactat-analytik pipettiert und 500 µl in ein Mikroreaktionsgefäß zur Glutamatanalytik überführt. Die optische Dichte der Probe wurde bei 680 nm gemessen. Dabei wurde die Probe soweit verdünnt, dass die OD in einem Bereich $0,1 < OD < 1$. Aus der optischen Dichte konnte direkt auf die Biotrockenmasse geschlossen werden. Hierfür wurde die Korrelation aus [Bec13] verwendet. Daher ergibt sich die Biotrockenmasse des Organismus aus der optischen Dichte nach der Gleichung 3.7.

Berechnung der Biotrockenmasse nach [Bec13]

$$c_{BTM}[g/l] = 0,5311 \cdot OD_{680nm} \quad (3.7)$$

3.2.5 Batchversuche - Parameter und Bedingungen

Allgemeine Betriebsparameter Die Versuche im Satzbetrieb fanden zur besseren Vergleichbarkeit mit den selben Parametern statt. Diese sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Einfluss der Vorkultur Zur Bestimmung des Einflusses der Vorkultur auf die Fermentation wurden Versuche mit einem LED beleuchteten Reaktor durchgeführt. Dieser wurde zum einen mit einer LED beleuchteten Vorkultur inokuliert und zum Vergleich

Tabelle 3.5: Betriebsparameter - Batchversuche

Betriebsparameter	Wert	
	LED	Halogen
Temperatur	30°C	
Rührerdrehzahl	550rpm	
pH-Wert	7,0 unreguliert	
Kühlwassertemperatur	27°C	5°C

mit einer Halogen beleuchteten Vorkultur. Der selbe Versuch wurde unter Halogen-Fermentationsbedingungen durchgeführt.

Einfluss der C-Quelle Zur Untersuchung der Tauglichkeit unterschiedlicher Substrate zur Wasserstoffproduktion wurden zunächst Versuche im Screeningbad angestellt. Hierfür wurden 100 ml Schottflaschen, wie sie auch für die Vorkulturen verwendet wurden, mit Nährmedium gefüllt und 1 ml Vorkultur angeimpft, mit Helium gespült und unter Halogen- beziehungsweise LED-Beleuchtung im Vorkulturbad kultiviert. Das Nährmedium enthielt hierbei unterschiedliche C-Quellen. Zur Bestimmung des gebildeten Wasserstoffs wurde dieser pneumatisch in einem 250 ml Messkolben aufgefangen. Nach erfolgreicher Wasserstoffproduktion wurde ein Batchversuch mit dem entsprechenden Medium durchgeführt.

3.2.6 Chemostatversuche

Tabelle 3.6: Betriebsparameter eines Chemostatversuches

Glutaminsäurekonzentration	Durchflussrate	Feedpumpe	Wastepumpe
[g/L]	[l/h]	[mL/min]	[mL/min]
1,5	0,096	1,6	3,6
0,5	0,096	1,6	3,6
2,0	0,096	1,6	3,6
1,5	0,192	3,2	5,2
1,0	0,096	1,6	3,6
1,5	0,24	4	6
2,5	0,096	1,6	3,6
1,5	0,096	1,6	3,6
1,5	0,264	4,4	6,4

Die Versuche im Chemostat liefen bei konstanten physikalischen Parametern ab. Diese waren ähnlich denen der Batchversuche. Variiert wurde hier hauptsächlich die Durchflussrate zum Bestimmen des optimalen Medieneintrags zur Wasserstoffproduktion so-

wie die Konzentration der Glutaminsäure im Feedmedium. Diese Parameter sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Um die Vergleichbarkeit der Einzelversuche zu gewährleisten wurden die unterschiedlichen Glutaminsäurekonzentrationen bei konstanter Durchflussrate, die unterschiedlichen Durchflussraten bei konstanter Glutaminsäurekonzentration durchgeführt. Diese Parameter wurden abwechselnd im System angefahren um eventuelle Einflüsse aus den vorhergehenden Parametern zu eliminieren. Die untersuchten Parameter sowie deren Permutation entsprechend des realen Versuchsvorgangs sind in Tabelle 3.6 eingetragen.

4 Ergebnisse

4.1 Batchversuche

Die Versuche Batchverfahren ergaben vergleichsweise gute Ergebnisse. So wurde in den meisten Versuchen eine erhebliche Menge Wasserstoff produziert. Es konnten ebenso die unterschiedlichen Einflüsse der Vorkulturen als auch der Medien und Beleuchtungsarten evaluiert werden. Die einzelnen Versuche variierten in ihrer Dauer und Ausbeute.

Halogen-Batch Die Halogen-Batch-Versuche erzeugten alle recht ähnliche Ergebnisse. Die Dauer eines Versuches erstreckte sich über einen Zeitraum von 40 Stunden. Anfangs lag die Milchsäurekonzentration bei $3,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, die Glutaminsäurekonzentration bei $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ entsprechend der Einwaage. Die optische Dichte lag bei circa 0,1 entsprechend einer Biotrockenmasse von $0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Der pH-Wert wurde zum Anfang auf 7,0 eingestellt. Im Laufe der Fermentation stieg der pH-Wert bis auf circa 9 an. Die Milchsäure war nach circa 20 Stunden zur Hälfte und nach 41 komplett verbraucht. Betrachtet man den Konzentrationsverlauf der Glutaminsäure, so lässt sich ähnliches feststellen. Allerdings war die Glutaminsäure bereits nach 20 Stunden aufgebraucht. Das Biomassewachstum begann wie bereits erwähnt bei einer Konzentration von $0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und steigerte sich bis auf durchschnittlich $2,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ nach 25 Stunden. Danach stagniert das Wachstum und kommt gänzlich zum Erliegen. Die Wasserstoffproduktion begann im Allgemeinen nach etwa 10 Stunden und erreichte ihr Maximum von durchschnittlich $160 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ nach etwa 23 Stunden. Verdeutlicht wird das genannte in Abbildung 4.1.

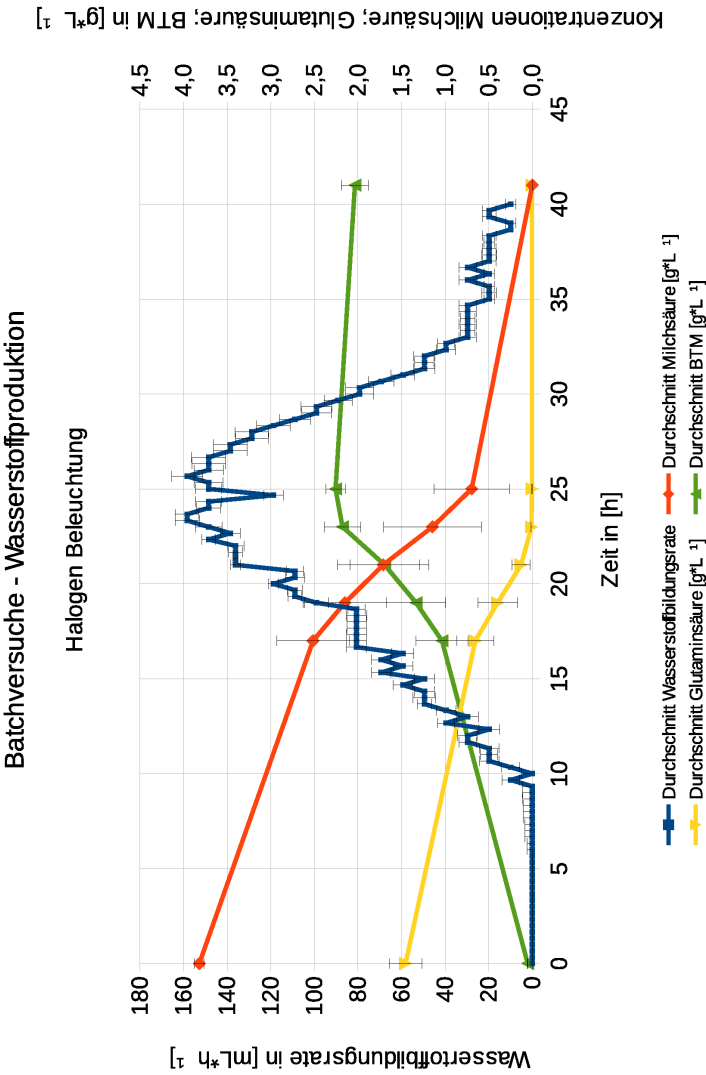


Abbildung 4.1: Verlauf - Halogen-Batch - Diagramm

Im Diagramm ist der durchschnittliche Verlauf einer Halogen-Batch-Fermentation zu erkennen. Die Werte ergaben sich aus den Mittelwerten dreier Versuche. Die Fehlerbalken an den Datenpunkten spiegeln die Standardabweichung wider. Erkennbar ist der steile Anstieg der Wasserstoffproduktion (blauer Graph) nach etwa 10 Stunden. Ebenso sind der Verlauf der Glutaminsäure und Milchsäurekonzentration (oranjer und gelber Graph) erkennbar. Der Verlauf der Biotrockenmasse ist durch den grünen Graph verdeutlicht.

LED-Batch Die LED-Batch-Versuche liefen im Allgemeinen länger als die Halogenversuche. Die durchschnittliche Laufzeit betrug ungefähr 65 Stunden. Die Anfangskonzentrationen der Biotrockenmasse, Glutaminsäure und Milchsäure entsprach den Bedingungen der Halogenversuche. Nach etwa 17 Stunden hat sich die Glutaminsäurekonzentration halbiert und liegt bei etwa $0,75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Milchsäurekonzentration halbierte sich erst nach circa 21 Stunden und war nach 45 Stunden komplett aufgebraucht. Die Wasserstoffproduktion begann wie in den Halogenversuchen ebenfalls nach etwa 10 Stunden und erreichte ihre maximale Rate nach etwa 30 Stunden. Diese lag hierbei bei etwa $70 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Dauer der Gesamtversuche betrug etwa 65 Stunden. Die Biotrockenmasse stieg während der Fermentation zum Anfang stark an auf maximal $2,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ nach etwa 41 Stunden. Danach stagnierte das Wachstum beziehungsweise bildete sich die Biomasse leicht zurück. Besser erkennbar ist der beschriebene Verlauf in Abbildung 4.2.

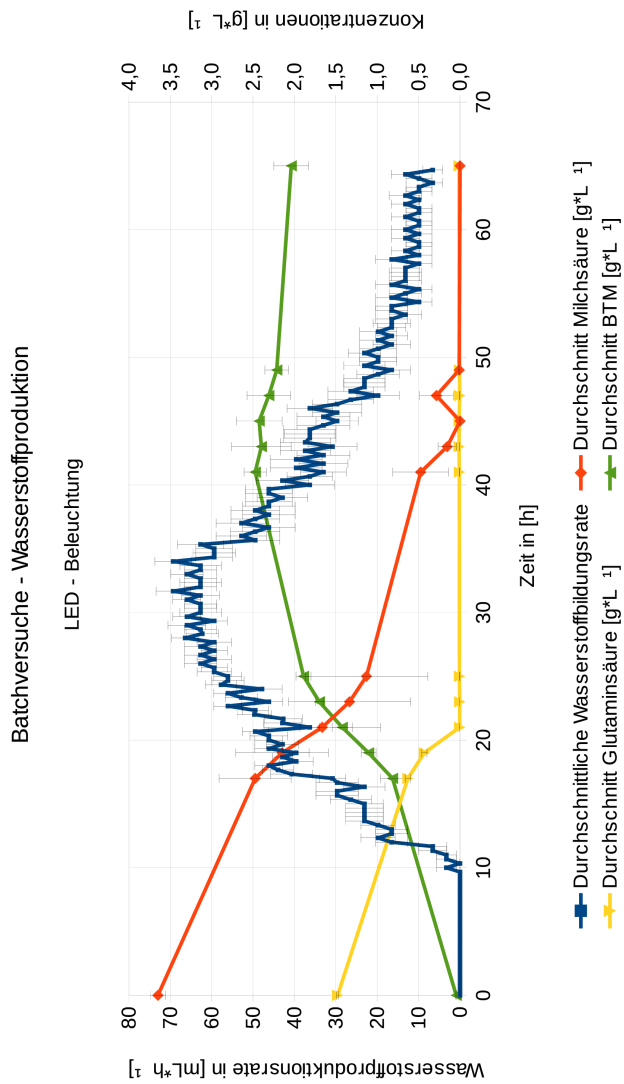


Abbildung 4.2: Verlauf - LED Batch - Diagramm

Im Diagramm ist der durchschnittliche Verlauf einer Batch-Fermentation mit LED-Beleuchtung zu erkennen. Die Werte ergaben sich aus den Mittelwerten dreier Versuche. Die Fehlerbalken an den Datenpunkten spiegeln die Standardabweichung wider. Erkennbar ist der steile Anstieg der Wasserstoffproduktion (blauer Graph) nach etwa 10 Stunden. Ebenso sind der Verlauf der Glutaminsäure und Milchsäurekonzentration (oranjer und gelber Graph) erkennbar. Der Verlauf der Biotrockenmasse ist durch den grünen Graph verdeutlicht.

Versuche zu unterschiedlichen Substraten Für die Versuche zu unterschiedlichen Substraten kamen Malat und Glycolsäure in einer Konzentration von $40 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$ zum Einsatz. Hierbei erwies sich die Substratanalytik als relativ schwierig, weshalb zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch keine Daten diesbezüglich für die Malatversuche vorlagen. Trotzdem sind die Daten der Wasserstoffproduktion vorhanden und liefern eindeutige Ergebnisse. In den Versuchen mit Glycolsäure war keine Wasserstoffproduktion, trotz konstantem Biomassewachstum, zu erkennen. Die Konzentration an Glutaminsäure nahm während der Fermentation kontinuierlich ab und war nach circa 21 Stunden vollständig aufgebraucht. Die Biomasse stieg kontinuierlich an bis zu einer Konzentration von $1,14 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Während der circa 45 Stunden dauernden Fermentation wurde circa die Hälfte an Glycolsäure verbraucht.

Die Versuche mit Malat erzeugten eine Wasserstoffproduktion von circa $50 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ nach etwa 20 Stunden Laufzeit. Die Produktion begann bei Stunde 15 und endete nach circa 25 Stunden.

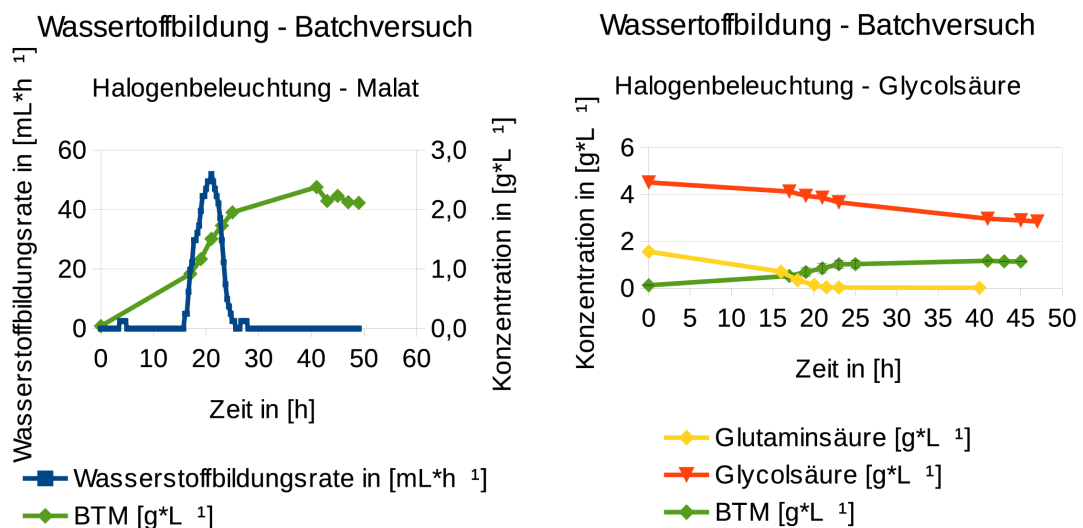


Abbildung 4.3: Verlauf der Fermentation bei unterschiedlichen Substraten

Diese Abbildung zeigt zwei Diagramme. Auf der linken Bildhälfte ist der Verlauf einer Fermentation mit Malat als C-Quelle dargestellt. Gut erkennbar ist hier der steile Anstieg und Abfall der Wasserstoffproduktionsrate (blauer Graph), sowie das kontinuierliche Ansteigen der Biotrockenmasse (grüner Graph). Das rechte Diagramm verdeutlicht den Verlauf einer Fermentation unter Verwendung von Glycolsäure als C-Quelle. Es konnte hierbei keine Wasserstoffproduktion festgestellt werden. Trotzdem stieg die Biomasse (grüner Graph) kontinuierlich an. Die Glutaminsäure (gelber Graph) wurde komplett verbraucht, die Glycolsäure (oranger Graph) nur zur Hälfte.

4.2 Chemostatversuche

Die Chemostatversuche dauerten im Allgemeinen etwa jeweils zwei Wochen, wobei während jedem Versuch verschiedene Parameter untersucht wurden. Für die Untersuchungen zu den Glutaminsäurekonzentrationen wurden circa fünf Volumenwechsel abgewartet, was bei einer Pumpenleistung von $96 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ circa zwei Tage dauerte. Zweites Kriterium war das Einstellen eines steady-states, das heißt es fanden keine Veränderungen mehr an Biomassekonzentration und Wasserstoffbildungsrate statt. In Abbildung 4.4 ist der Verlauf eines Chemostatversuchs dargestellt. Dieser Versuch erstreckte sich über 600 Stunden. Während der anfänglichen Batchphase (bis 17 Stunden) sanken die Konzentrationen an Milch- und Glutaminsäure rapide ab, die Wasserstoffbildungsrate sowie die Biotrockenmasse stiegen an. Nach 17 Stunden begann die erste Rate mit $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Glutaminsäure bei einer Eintragsgeschwindigkeit von $96 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Dies entsprach $0,144 \text{ g}$ Glutaminsäure pro Stunde. Diese wurde, im Gegensatz zum Lactat, komplett aufgebraucht. Die Biomasse pegelte sich bei einem Wert von etwa $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ein. Die Wasserstoffbildungsrate lag bei circa $140 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. An diesen Lauf schloss sich eine Glutaminsäurekonzentration von $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bei gleicher Durchflussrate an. Dies bedeutet, dass pro Stunde nunmehr nur noch $0,048 \text{ g}$ Glutaminsäure pro Stunde zugeführt wurden. Diese wurden ebenfalls komplett aufgebraucht, wobei die Lactatkonzentration auf etwa $2,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ anstieg. Die Biomassekonzentration und die Wasserstoffbildungsrate hingegen fielen ab auf $70 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ und circa $1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Biotrockenmasse. Nach diesem Versuch wurde die Glutaminsäurekonzentration auf $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ angehoben, woraus ein stündlicher Eintrag von $0,192 \text{ g}$ erreicht wurde. Hierbei stieg die Konzentration im Reaktor zunächst auf circa $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ an und fiel zum Ende hin auf 0. Die Milchsäurekonzentration sank rapide auf etwa $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ab, wobei die Wasserstoffbildung und das Biomassewachstum stark zunahmen. Im nächsten Schritt wurde eine höhere Durchflussrate bei einer Glutaminsäurekonzentration von $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gefahren. Die Rate betrug $0,192 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ und führte zu einem Eintrag von $0,288 \text{ g}$ Glutaminsäure pro Stunde. Hieraus resultierte zunächst ein starker Anstieg der Substratkonzentrationen im Reaktor. Die Milchsäurekonzentration stieg auf etwa $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ die Glutaminsäurekonzentration auf circa $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ an. Dies geschah bei sinkender Biomassekonzentration auf $0,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bei einer Wasserstoffbildungsrate von $50 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Als nächstes wurde eine Feedlösung mit $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Glutaminsäure bei $96 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ eingesetzt. Hierbei fiel die Konzentration an Glutaminsäure auf 0, die Biomasse sowie Wasserstoffbildungsrate stieg erneut an. Die Lactatkonzentration fiel auf $1,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Der weitere Betrieb geschah bei einer Durchflussrate von $240 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Hierbei erfolgte ein stündlicher Eintrag an Glutaminsäure von $0,36 \text{ g}$. Die Glutaminsäurekonzentration sowie die Milchsäurekonzentration pendelten sich hierbei bei circa $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ein. Die Biotrockenmasse sank auf $0,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ab. Die Wasserstoffbildungsrate erreichte einen Wert von $10 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$.

Es folgte nun ein Feedmedienwechsel auf eine Glutaminsäurekonzentration von $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Die Biotrockenmasse stieg dabei stark an, ebenso wie die Wasserstoffbildungsrate. Die Milchsäurekonzentration lag nahe 0. Das folgende Setting orientierte sich an der ersten Rate und erzielte ähnliche Ergebnisse. Lediglich die Milchsäure wurde komplett aufgebraucht. Die letzte Rate erfolgte mit einem Durchfluss von $0,264 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Hier fielen die Biotrockenmasse auf circa $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und die Wasserstoffbildungsrate auf $20 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ bei steigender Lactatkonzentration.

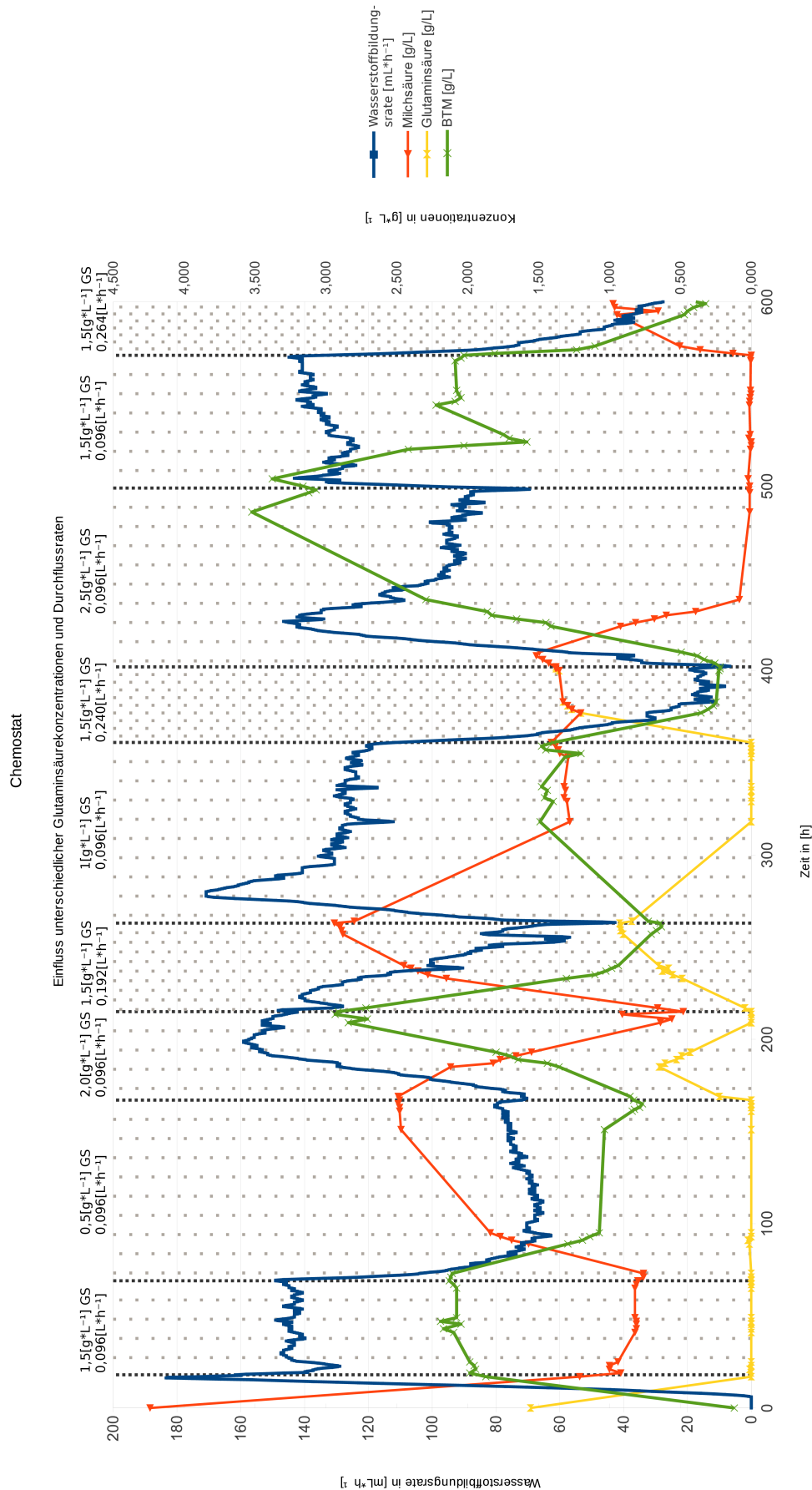


Abbildung 4.4: Verlauf - Chemostat

Dieses Diagramm zeigt den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (grün), der Glutaminsäurekonzentration (gelb), der Milchsäurekonzentration (orange) und der Wasserstoffbildungsrate (blau) während eines Chemostatversuches. Dunkelgraue Linien zeigen den Wechsel zwischen Betriebsbedingungen an. Hellgraue Linien zeigen Volumenwechsel im System an.

5 Diskussion

5.1 Batchversuche

Einfluss der Beleuchtung Die Ergebnisse der Beleuchtungsabhängigkeit ließen eine eindeutige Aussage zu. Bei Beleuchtung mit Halogenlampen liegt die Wasserstoffbildungsrate deutlich höher als bei Beleuchtung mit LED-Lampen. Dies liegt möglicherweise an den unterschiedlichen Spektren der jeweiligen Leuchtmittel. Halogenleuchten erwiesen sich im Allgemeinen als geeigneter, da sie ein sonnenlichtähnliches Spektrum besitzen. Die Spektren von LED-Leuchtmitteln sind scharf abgegrenzt und ermöglichen somit keine weitgreifende Anregung der Photosysteme von *Rhodobacter sphaeroides*. In der Literatur wurde ebenso zumeist auf Halogenlampen zur Beleuchtung zurückgegriffen. Die höhere Effizienz der Halogenleuchten erklärt auch den steilen Anstieg der Wasserstoffbildungsrate und den damit in Verbindung stehenden Verbrauch an Substraten, insbesondere der Milchsäure. Die höchsten Aktivitäten werden nach dem Verbrauch der Glutaminsäure erreicht. Es wäre denkbar, dass beim Abbau der Glutaminsäure als Nebenprodukt Ammonium entsteht, welches die Exprimierung der zur Wasserstoffbildung nötigen Nitrogenase inhibiert. Enzymatisch findet hierbei eine Desaminierung der Glutaminsäure unter Bildung von 2-Oxoglutarsäure und Ammonium statt. Hierbei wird gleichzeitig NAD^+ , beziehungsweise NADP^+ reduziert. Katalysiert wird dies durch das Enzym Glutamatdehydrogenase. Die Reaktion ist im Detail in Abbildung 5.1 dargestellt. Diese Annahme trifft auf alle durchgeführten Versuche zu [NY].

Screening unterschiedlicher Substrate Allgemein lässt sich feststellen, dass Lactat von allen eingesetzten Substraten die besten Wasserstoffproduktionswerte lieferte. Erwartet wurde ein schlechteres Abschneiden der Glycolsäure, da diese lediglich maximal vier Protonen für das Photosystem zur Abspaltung bereitstellen kann. Bei Lactat und Malat wurden ähnliche Raten erwartet, wobei unter Verwendung von Lactat deutlich mehr Wasserstoff generiert wurde. Die eingesetzte Menge von 40 mM Malat hätte eine Wasserstoffmenge von 240 mM Wasserstoff ergeben müssen nach der Gleichung:

Wasserstoffbildung aus Malat



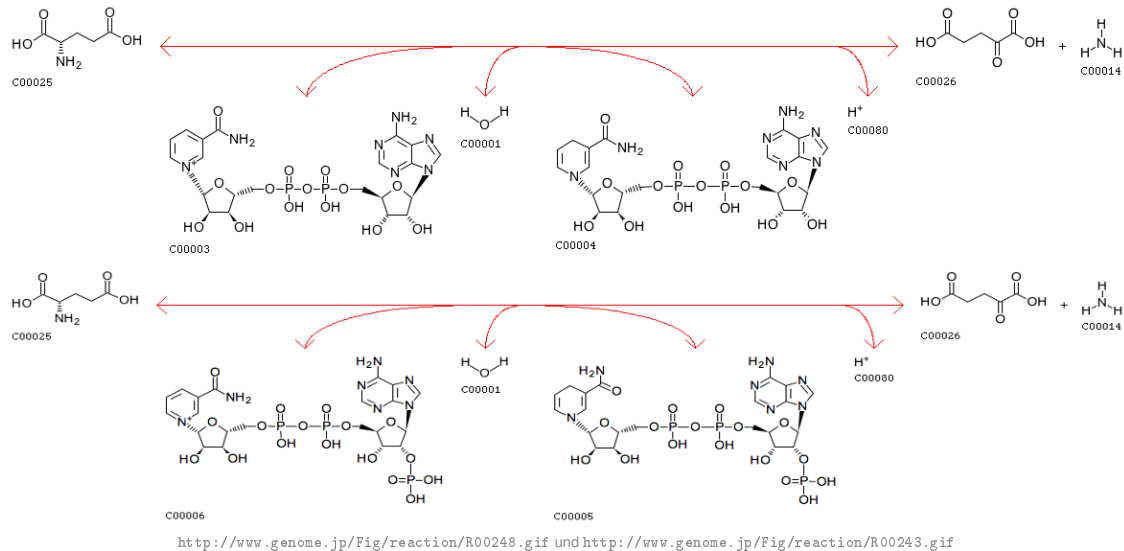


Abbildung 5.1: Abbau von Glutaminsäure durch die Glutamatdehydrogenase

Diese Abbildung zeigt die durch die Glutamatdehydrogenase katalysierten Reaktionen. Bei der unteren Reaktion wird NADP^+ als Oxidationsmittel, in der oberen Reaktion NAD^+ verwendet. Die Komponenten sind nach der KEGG-Compound-Nomenclature benannt. C00025 bezeichnet Lactat, C00001 Wasser, C00003 NAD^+ , C00004 NADH , C00080 H^+ , C00026 2-Oxoglutarinsäure, C00014 Ammonium, C00006 NADP^+ und C00005 NADPH

Wasserstoffbildung aus Lactat



Hierbei würde sich durch das molare Volumen ein Wasserstoffvolumen von 5,3 l ergeben. Dies gilt sowohl für Lactat als auch für Malat. Gemessen daran läge die Ausbeute an Wasserstoff bei Malat bei circa 5,3%. Mit Lactat wird eine Ausbeute von circa 30% erreicht. Diese Diskrepanzen sind möglicherweise durch Biomassewachstum und ähnliche Nebeneffekte eines biologischen Systems zu erklären. So ist es denkbar, dass Teile der Substrate auch andere metabolische Pathways einschlagen und somit den Photosystemen nicht zur Verfügung stehen. Besonders im Fall von Malat scheint dies wahrscheinlich, da Malat einen wichtigen Bestandteil des Citratzyklus darstellt und somit möglicherweise an dieser Stelle als Akzeptor dient. An dieser Stelle wird Malat entweder unter Abspaltung von Wasser durch das Enzym Malathydrolyase zu Fumarsäure umgesetzt, oder es wird Malyl-Coenzym-a gebildet durch die Malat-Coenzym-A-Transferase. Dies geschieht unter Verbrauch von Succinyl-Coenzym-A und unter Bildung von Succinat [TYL⁺01] [ZBMF09]. Außerdem scheint es wahrscheinlich, dass ein Teil der Protonen zur Polyhydroxybutyratsynthese genutzt wird. Dieser Speicherstoff ist charakteristisch für PNS insbesondere *Rhodobacter sphaeroides* und *R. rubrum* [EM11]. Diese

Ergebnisse decken sich nicht mit denen der Literatur. Hierbei wurde zum Beispiel beschrieben, dass Malat die höchste Ausbeute bietet [ERO08].

5.2 Chemostatversuche

Die Chemostatversuche zeigten zunächst, dass es möglich ist kontinuierlich Wasserstoff mit *Rhodobacter sphaeroides* zu produzieren. Dabei verhält sich das Chemostatssystem erwartungsgemäß. Es war zu vermuten, dass bei niedrigen Durchflussraten aufgrund des geringen Substrateintrags nur kleine Wasserstoffraten bei relativ hohen Biomassekonzentrationen gemessen werden können. Die hohen Biomassekonzentrationen ergeben sich hierbei durch das geringe Austragsvolumen. Die Organismen haben somit viel Zeit mit wenig Substraten zu wachsen. Die Substratlimitierung zeigt sich auch an den im Reaktor verbliebenen Mengen, welche bei niedrigen Durchflussraten gegen Null gingen. Mit steigender Durchflussrate erhöht sich entsprechend der Substrateintrag und damit auch die Wasserstoffbildungsrate. Gleichzeitig nimmt die Biomassekonzentration mit steigendem Austrag an Medium kontinuierlich ab. Daraus resultieren letztlich steigende Substratrückstände im Reaktor sowie eine sinkende Wasserstoffbildungsrate. Letztlich gilt es das Optimum an Feedgeschwindigkeit zu finden, bei der die höchste Wasserstoffausbeute erreicht wird. Erkennbar wird dies am besten im x-D-Diagramm (Abbildung 5.2). Hier wird deutlich, dass mit zunehmender Durchflussrate zunächst ein Anstieg der Wasserstoffbildungsrate sowie der Biomasse zu verzeichnen ist. Dies erreicht das Maximum bei $120 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einer Wasserstoffbildungsrate von circa $150 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Mit zunehmender Ausspülung nimmt die Biomasse sowie die Wasserstoffbildungsrate ab. Die Konzentration an Lactat steigt stark an. Glutaminsäure hingegen wird mit steigenden Raten fast vollständig aufgebraucht und lässt somit die Vermutung zu, dass es sich hierbei um das limitierende Substrat handelt. Eine Erhöhung der Glutaminsäurekonzentration ist laut Literatur aber nicht zu empfehlen, da das Verhältnis zwischen C- und N-Quelle entscheidend für die Wasserstoffproduktion ist [KOK02]. Trotzdem sollte der Einfluss der Glutaminsäurekonzentration im Chemostat ermittelt werden. Hierfür wurde erwartet, dass bei sehr niedrigen Glutaminsäurekonzentrationen sowohl die Bio-trockenmasse als auch die Wasserstoffbildungsrate eher gering ausfallen, aufgrund der Limitation der Stickstoffquelle. Mit steigender Konzentration wurde auch mit steigender Biomassekonzentration sowie Wasserstoffbildungsrate gerechnet, bis zum Überschreiten des optimalen Verhältnisses an C- zu N-Quelle bei $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutaminsäure zu $3,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Lactat. Danach wurde mit steigender Biomasse, aber sinkender Wasserstoffproduktion gerechnet. Erklärbar wäre dies mit der möglichen Inhibition der Nitrogenase-expression durch auftretendes Ammonium im Zuge des Glutamatmetabolismus. Die

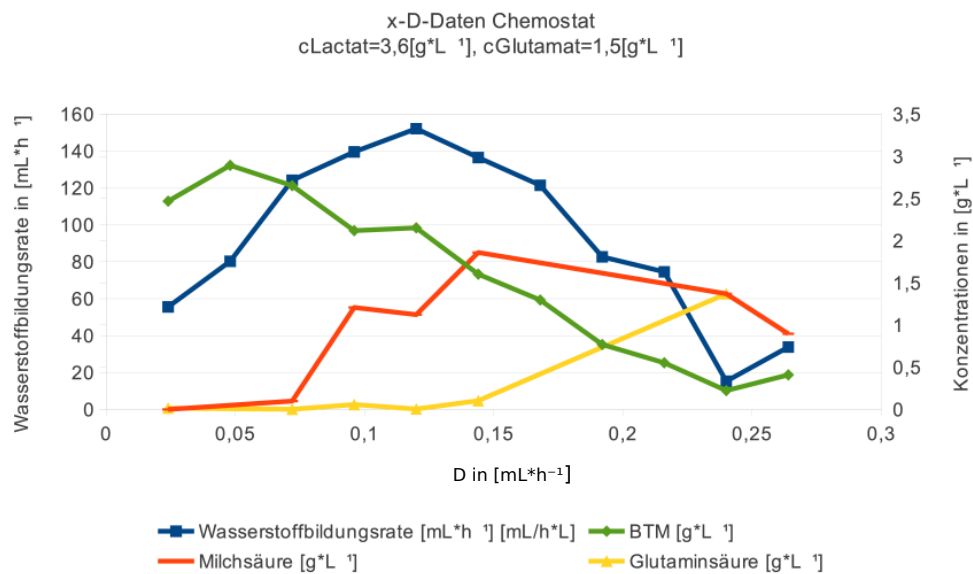


Abbildung 5.2: x-D-Diagramm Durchflussraten

Dieses Diagramm verdeutlicht den Verlauf der Biomassekonzentration (grün), der Substratkonzentrationen (Glutaminsäure gelb und Lactat orange) und der Wasserstoffbildungsrate (blau) bei unterschiedlichen Durchflussraten. Die Glutaminsäurekonzentration im Feedmedium betrug 1,5 g·l⁻¹ die Lactatkonzentration 3,6 g·l⁻¹. Das Maximum an Wasserstoff wird bei circa 120 ml·h⁻¹ erreicht.

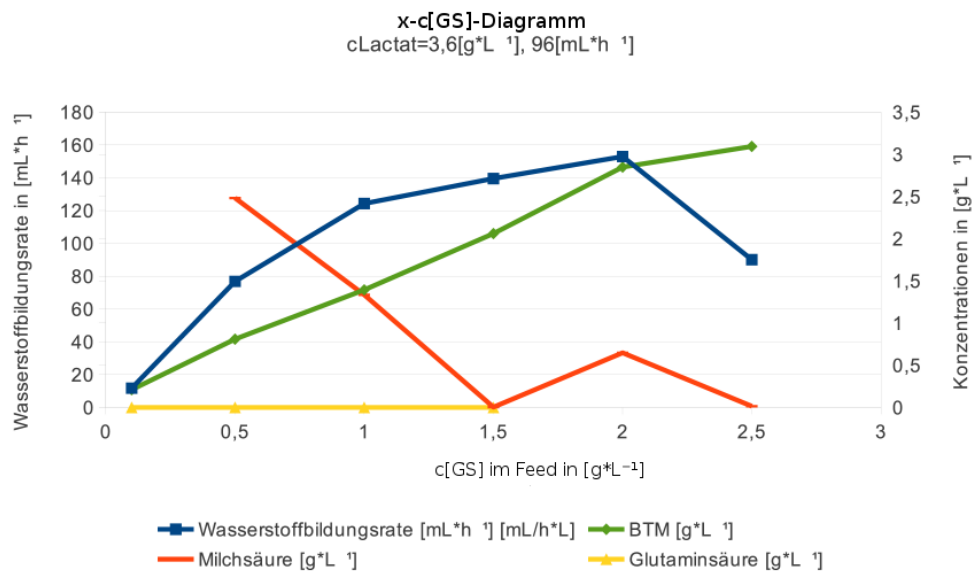


Abbildung 5.3: x-c[GS]-Diagramm Glutaminsäurekonzentrationen

Dieses Diagramm verdeutlicht den Verlauf der Biomassekonzentration (grün), der Substratkonzentrationen (Glutaminsäure gelb und Lactat orange) und der Wasserstoffbildungsrate (blau) bei unterschiedlichen Glutaminsäurekonzentrationen. Das Maximum wird bei 2,0 g·l⁻¹ erreicht.

durchgeführten Versuche bestätigten diese Annahmen. Bei sehr niedrigen Glutaminsäurekonzentration entfällt auch die Wasserstoffbildungsrate eher gering aus, was zusätzlich mit der extrem niedrigen Biomassekonzentration korreliert. Die Wasserstoffbildung steigt mit zunehmender Glutaminsäurekonzentration an und erreicht ihr Maximum entgegen der Erwartung nicht bei $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sondern bei $2,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutaminsäure. Danach fällt die Rate wieder ab, die Biotrockenmasse steigt weiterhin an. Erkennbar wird dies auch im x-D-Diagramm (siehe Abbildung 5.3). Der Anstieg der Lactatkonzentration bei $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutaminsäure ist möglicherweise auf einen Messfehler zurückzuführen. Schlussendlich ergeben sich ähnliche Wasserstoffraten in den Optima beider Versu-

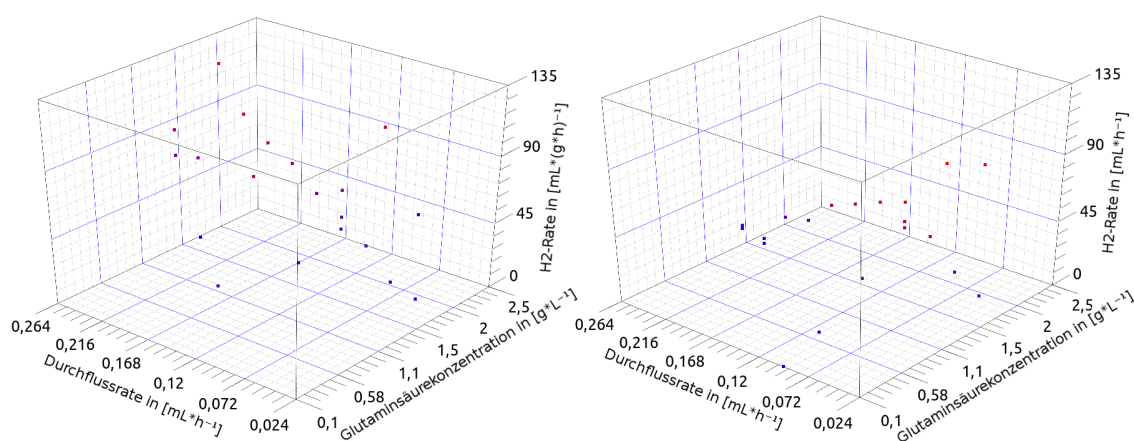


Abbildung 5.4: Einfluss der Betriebsbedingungen auf die Wasserstoffproduktion im Chemostat

Diese beiden 3D-Plots zeigen die Auswirkung unterschiedlicher Betriebsparameter auf die Wasserstoffproduktionsrate an. Links ist dabei die Wasserstoffproduktionsrate pro Biomasse dargestellt, rechts wurde die Rate über das Glutaminsäure-/Milchsäureverhältniss normiert. Die Farbskala der Datenpunkte dient als Orientierung zur Wasserstoffbildungsrate. Sie reicht von blau (niedrige Rate) bis rot (hohe Rate).

che. Bei $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutaminsäure und einer Verdünnungsrate von $120 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ werden circa $152 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ Wasserstoff gebildet, den gleichen Wert erreicht auch der Chemostat mit $2,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutaminsäure und einer Verdünnungsrate von $96 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Betrachtet man die Wasserstoffbildungsraten pro Biomasse so ist festzustellen, dass die höchsten Raten bei hohen Verdünnungsraten sowie einer Glutaminsäurekonzentration von $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht werden. Im 3D-Plot (Abbildung 5.4) ist dieser Zusammenhang sehr gut zu erkennen. Es ist ebenso der nahezu lineare Anstieg der Bildungsrate bei den Parametern: Glutaminsäurekonzentration $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ und einer steigenden Verdünnungsrate erkennbar. Betrachtet man hingegen die Wasserstoffproduktionsrate normiert über das Glutaminsäure-/Milchsäureverhältniss so lässt sich Gegenteiliges feststellen. Hier werden die höchsten Raten bei hohen Glutaminsäurekonzentrationen und niedrigen Durchflussraten erreicht.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich für die Versuche feststellen, dass im Batchbetrieb die Verwendung von Lactat als Kohlenstoffquelle die besten Ergebnisse liefert. Malat ermöglichte ebenso eine gewisse Produktion und Glycolsäure ergab keine messbaren Ergebnisse. Daher ist von Glycolsäure als C-Quelle, aufgrund der schlechten Ergebnisse und in Hinblick auf das Gefahrenpotential der Substanz, abzusehen. Des Weiteren sollten für die Beleuchtung weiterhin Halogenlampen verwendet werden, da diese die besten Wasserstoffproduktionsergebnisse lieferten. Die Verwendung von speziellen Vorkulturen vor allem im Hinblick auf die Beleuchtung erwies sich als nicht notwendig und kann somit weiterhin unterlassen werden. Als sinnvoll hingegen stellte sich das Verwenden eines automatisierten Systems zum Auffrischen der Vorkultur am Wochenende heraus. Dies wurde in dieser Arbeit unter dem Punkt „Minichemostat“ behandelt. Die Versuche zur respirofermentativen Kultivierung des Organismus erwiesen sich ebenso als nicht erfolgreich. Die Chemostatversuche ergaben klare Bedingungen für eine optimale Wasserstoffproduktion. Diese liegen bei entweder $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Glutaminsäure und einer Durchflussrate von $120 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, oder bei einer Glutaminsäurekonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und einer Verdünnungsrate von $96 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Nachteil hoher Glutaminsäurekonzentrationen lag vor allem in der hohen resultierenden Biotrockenmasse, sodass in regelmäßigen Abständen das System gespült werden musste um Verstopfungen die bis zum Ausfall des Systems führen konnten, zu vermeiden. Daher ist es eher ratsam entweder hohe Glutaminsäurekonzentrationen mit hohen Verdünnungsraten zu fahren, oder niedrigere Glutaminsäurekonzentrationen bei langsameren Raten. Letzteres scheint im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit des Systems vielversprechender.

7 Ausblick

Die ermittelten Parameter können als Ausgangspunkt für weitere Forschungen auf diesem Gebiet dienen. So könnten im Bereich der Batchversuche zusätzliche Substrate, insbesondere organische Säuren weiterhin auf ihre Verwendbarkeit gescreent werden. Laut Literatur scheint hier besonders Acetat, Succinat und Butyrat als besonders aussichtsreich [ERO08] [IND13]. Des Weiteren sind im Hinblick auf die Effizienz des Verfahrens möglicherweise auch weiterhin Optimierungsversuche mit LED-Beleuchtung ratsam. Besonders auch für das Chemostatsystem wären kontinuierliche Versuche mit LED-Beleuchtung sehr interessant. Außerdem sollten Versuche beziehungsweise Analysen zum Metabolismus des Organismus durchgeführt werden, um zu klären an welchen Stellen Protonen möglicherweise auf andere Pathways verteilt werden. Dies ist bei LED-Fermentationen besonders interessant, da hier ein starker Anstieg der Viskosität des Mediums gegen Ende der Fermentation erkennbar war. Außerdem sollte Analytik im Bereich der PHB-Synthese stattfinden, um zu klären welche Bedingungen für den Aufbau von Speicherstoffen begünstigend wirken, um dies weitestgehend zu unterbinden. Gleichzeitig ist der Einsatz genetisch modifizierter Organismen zu überlegen und deren Effizienz zu validieren. Für das Chemostatsystem sind ebenfalls weitere Optimierungsversuche im Hinblick auf physikalische Parameter wie Temperatur und pH-Wert denkbar. Außerdem wäre das Durchführen von Hell-Dunkel-Zyklen interessant um anwendungsnahe Resultate zu erzielen. In diesem Zusammenhang wäre auch der Test des Systems im Feldversuch zu überlegen und dahingehend eine mögliche Kokultivierung mit anderen Organismen zur CO₂-Fixierung und die damit in Verbindung stehende autarke Versorgung mit organischen Säuren zu gewährleisten.

Literaturverzeichnis

- [Aac] AACHEN, HWTH: European Hydrogen Infrastructure and Production. http://www.ika.rwth-aachen.de/r2h/index.php/European_Hydrogen_Infrastructure_and_Production, Abruf am 10.07.2014
- [AKK02] AKKERMAN, I: Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. In: International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002), Nov, Nr. 11-12, 1195–1208. [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00071-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00071-X). – DOI 10.1016/S0360-3199(02)00071-X. – ISSN 0360-3199
- [Bec13] BECHTER, Bastian: Photofermentative Produktion von Biowasserstoff mittels Rhodobacter sphaeroides DSM 158, Technische Universität Dresden, Diplomarbeit, 2013
- [CZFK07] CHOUDHARY, M. ; ZANHUA, Xie ; FU, Y. X. ; KAPLAN, S.: Genome analyses of three strains of Rhodobacter sphaeroides: evidence of rapid evolution of chromosome II. In: J Bacteriol 189 (2007), Mar, Nr. 5, 1914–1921. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01498-06>. – DOI 10.1128/JB.01498-06
- [die] Das Kväener-Verfahren. <http://www.diebrennstoffzelle.de/wasserstoff/herstellung/kvaerner.shtml>, Abruf am 10.07.2014
- [DLN11] DAVID L .NELSON, Michael M. C.: Biochemie. Bd. 4. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011
- [EM11] EROGLU, Ela ; MELIS, Anastasios: Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. In: Bioresource Technology 102 (2011), Sep, Nr. 18, 8403–8413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>. – DOI 10.1016/j.biortech.2011.03.026. – ISSN 0960-8524
- [ERO08] EROGLU, I: Hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. In: International Journal of Hydrogen Energy 33 (2008), Jan, Nr. 2, 531–541. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.025>. – DOI 10.1016/j.ijhydene.2007.09.025. – ISSN 0360-3199
- [IND13] IMAM, Saheed ; NOGUERA, Daniel R. ; DONOHUE, Timothy J.: Global in-

- sights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. In: BMC Systems Biology 7 (2013), Nr. 1, 89. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-7-89>. – DOI 10.1186/1752-0509-7-89. – ISSN 1752-0509
- [ITP84] IMHOFF, J. F. ; TRUPER, H. G. ; PFENNIG, N.: Rearrangement of the Species and Genera of the Phototrophic "Purple Nonsulfur Bacteria". In: International Journal of Systematic Bacteriology 34 (1984), Jul, Nr. 3, 340–343. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-34-3-340>. – DOI 10.1099/00207713-34-3-340. – ISSN 1465-2102
- [JD] JOHANN DEISENHOFER, Robert H.: Lexikon der Biologie: Purpurbakterien. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/purpurbakterien/55020>, Abruf am: 13.07.2014
- [KOK02] KOKU, H: Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. In: International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002), Nov, Nr. 11-12, 1315–1329. [http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199\(02\)00127-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3199(02)00127-1). – DOI 10.1016/s0360-3199(02)00127-1. – ISSN 0360-3199
- [Lina] LINDE: Dampfreformierung. http://www.linde-engineering.de/de/process_plants/hydrogen_and_synthesis_gas_plants/gas_generation/steam_reforming/index.html, Abruf am: 10.07.2014
- [Linb] LINDE: partielle Oxidation. http://www.linde-engineering.de/de/process_plants/hydrogen_and_synthesis_gas_plants/gas_generation/partial_oxidation/index.html, Abruf am: 10.07.2014
- [NAC09] NEIL A. CAMPBELL, Jane B. R.: Biologie. Bd. 8. Pearson Studium, 2009. – 1917 S.
- [NFC12] NICOLET, Y. ; FONTECILLA-CAMPS, J. C.: Structure-Function Relationships in [FeFe]-Hydrogenase Active Site Maturation. In: Journal of Biological Chemistry 287 (2012), Apr, Nr. 17, 13532–13540. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r111.310797>. – DOI 10.1074/jbc.r111.310797. – ISSN 1083-351X
- [NY] NISHIZUKA Y., Seyama Y.: Cellular Functions and Metabolic Maps. <http://>

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+rsp00250, Abruf am 23.07.2014

- [SKS⁺97] SCHINDELIN, H. ; KISKER, C. ; SCHLESSMAN, J. L. ; HOWARD, J. B. ; REES, D. C.: Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. In: Nature 387 (1997), May, Nr. 6631, 370–376. <http://dx.doi.org/10.1038/387370a0>. – DOI 10.1038/387370a0
- [SMKI13] SAKURAI, Hidehiro ; MASUKAWA, Hajime ; KITASHIMA, Masaharu ; INOUE, Kazuhito: Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. In: Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews 17 (2013), Dec, 1–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001>. – DOI 10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001. – ISSN 1389–5567
- [Sto97] STOWELL, M. H.: Light-Induced Structural Changes in Photosynthetic Reaction Center: Implications for Mechanism of Electron-Proton Transfer. In: Science 276 (1997), May, Nr. 5313, 812–816. <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5313.812>. – DOI 10.1126/science.276.5313.812. – ISSN 1095–9203
- [TBa] TU-BRAUNSCHWEIG: BRENDA The comprehensive Enzyme Information System EC=1.12.7.2. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=1.12.7.2, Abruf am 12.07.2014
- [TBb] TU-BRAUNSCHWEIG: BRENDA The comprehensive Enzyme Information System EC=1.18.6.1. http://http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=1.18.6.1, Abruf am 13.07.2014
- [TYL⁺01] TSENG, C.-P. ; YU, C.-C. ; LIN, H.-H. ; CHANG, C.-Y. ; KUO, J.-T.: Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of Escherichia coli Fumarase (FumA, FumB, and FumC) Activity. In: Journal of Bacteriology 183 (2001), Jan, Nr. 2, 461–467. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.2.461-467.2001>. – DOI 10.1128/jb.183.2.461–467.2001. – ISSN 0021–9193
- [VAD⁺12] VOLBEDA, A. ; AMARA, P. ; DARNAULT, C. ; MOUESCA, J.-M. ; PARKIN, A. ; ROESSLER, M. M. ; ARMSTRONG, F. A. ; FONTECILLA-CAMPS, J. C.: X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from Escherichia coli. In: Proceedings of the National

Academy of Sciences 109 (2012), Apr, Nr. 14, 5305–5310. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119806109>. – DOI 10.1073/pnas.1119806109. – ISSN 1091–6490

[VJ99] VERMÉGLIO, André ; JOLIOT, Pierre: The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. In: Trends in Microbiology 7 (1999), Nov, Nr. 11, 435–440. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01625-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01625-x). – DOI 10.1016/s0966-842x(99)01625-x. – ISSN 0966–842X

[ZBMF09] ZARZYCKI, J. ; BRECHT, V. ; MULLER, M. ; FUCHS, G.: Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (2009), Dec, Nr. 50, 21317–21322. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908356106>. – DOI 10.1073/pnas.0908356106. – ISSN 1091–6490

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, 31.08.2014